



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ
CAMPUS “PROF^a. CINOBELINA ELVAS”
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA

SELEÇÃO DE GENES DE REFERÊNCIA PARA
NORMALIZAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA EM TECIDOS
DE CODORNAS

FABIANA CRISTINA BELCHIOR DE SOUSA

BOM JESUS – PI

2016

FABIANA CRISTINA BELCHIOR DE SOUSA

**SELEÇÃO DE GENES DE REFERÊNCIA PARA
NORMALIZAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA EM TECIDOS
DE CODORNAS**

Orientadora: Prof^a Dr.^a Katiene Régia Silva Sousa

Co-orientador: Dr. Carlos Souza do Nascimento

Dissertação apresentada ao *Campus* Prof^a Cinobelina Elvas da Universidade Federal do Piauí, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação Zootecnia, na área de Produção Animal (linha de pesquisa Melhoramento e Reprodução Animal), para obtenção do título de Mestre.

BOM JESUS – PI

2016

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ
CAMPUS "PROFª. CINOBELINA ELVAS"
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA

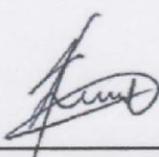
CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

**Título: SELEÇÃO DE GENES DE REFERÊNCIA PARA
NORMALIZAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA EM TECIDOS DE
CODORNAS**

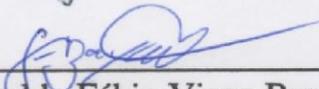
Autora: Fabiana Cristina Belchior de Sousa
Orientadora: Profª Drª. Katiene Régia Silva Sousa
Co-orientador: Dr. Carlos Souza do Nascimento

Aprovada em: 18/02/2016

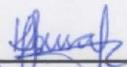
Banca Examinadora



Prof. Dr. José Lindenberg Rocha Sarmento



Dr. Geraldo Fábio Viana Bayão



Profª. Drª. Katiene Régia Silva Sousa

Bom Jesus-PI

2016

FICHA CATALOGRÁFICA
Universidade Federal do Piauí
Biblioteca Setorial de Bom Jesus
Serviço de Processamento Técnico

S725s Sousa, Fabiana Cristina Belchior de.
Seleção de genes de referência para normalização da expressão
gênica em tecidos de codornas. / Fabiana Cristina Belchior de Sousa.
– 2016.
59 f.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Piauí, Campus
Prof.^a Cinobelina Elvas, Programa de Pós-Graduação em Zootecnia,
área de Produção Animal (Melhoramento e Reprodução Animal),
Bom Jesus-Pi, 2016.

Orientação: “Prof.^a Dr.^a Katiene Régias Silva Sousa”.

1. Expressão gênica. 2. Genes normalizadores.
3. RT-qPCR4. Título I.

CDD 636.5

À Deus por permitir que eu chegasse até aqui.

Aos meus pais, Adão Belchior de Sousa e Valdenia Alves da Silva. Meu pai, esperançoso e sonhador, o homem que me ama e me incentiva a todo o momento. Minha mãe, mulher forte, batalhadora, que tem os filhos sempre em primeiro lugar. Quisera eu me parecer um pouco mais com ela.

Aos meus irmãos, Fabio Belchior, Rayssa Belchior e Ravena Maria Belchior, com os quais, sei que posso contar em qualquer momento.

Aos meus sobrinhos, Diogo Marcos e Enzo Gabriel

Ao meu namorado, Marcos André Arrais de Sousa

Aos professores, pelos ensinamentos.

DEDICO

AGRADECIMENTO

A Deus, por me permitir todas as coisas.

Aos meus pais, por serem incansáveis, pelo esforço em enfrentar todas as dificuldades, pela compreensão e por todo amor destinado a mim.

À professora Dr^a Katiene Régia Silva Sousa, por toda ajuda, ensinamentos e orientação, pela paciência e compreensão infinita, e principalmente, por acreditar e apostar em mim.

Ao co-orientador Carlos Souza do Nascimento por ter me ajudado com o experimento por todo ensinamento, paciência e dedicação. Muito Obrigada!

A minha amiga Maise Macário, pelos ensinamentos, ajuda sempre gentil e dedicada.

A Universidade Federal do Piauí, *Campus Prof^a Cinobelina Elvas* pelo gentil acolhimento.

À FAFEPI pela bolsa durante doze meses.

Aos companheiros do programa de Pós-Graduação em Zootecnia.

Aos amigos de Aracaju que me acolheram tão bem, Milly, Diana, Najara, Isis, Geneane, Aparecido, Adriano, meu muito obrigada e espero um dia revê-los.

À república ap.201, por ter me acolhido tão bem durante sete meses, Mona, Luciana e meu querido amigo Franciel, muito obrigada por tudo! Obrigada Fran pelos dias de descontração quando a saudade de casa era grande!

Enfim, a todos os familiares, amigos e colegas que direta ou indiretamente contribuíram com essa realização.

“É muito melhor arriscar coisas grandiosas, alcançar triunfos e glórias, mesmo se expondo ao fracasso, do que formar fila com os pobres de espírito, que nem gozam muito, nem sofrem muito, porque vivem nessa penumbra cinzenta que não conhece vitória nem derrota”

Franklin Delano Roosevelt

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	x
LISTA DE FIGURAS.....	xi
LISTA DE QUADRO.....	xii
RESUMO GERAL.....	xiii
GERAL ABSTRACT.....	xiv
INTRODUÇÃO GERAL.....	15
 CAPÍTULO 01. REVISÃO DE LITERATURA.....	17
1. CODORNA EUROPEIA (<i>Coturnix coturnix coturnix</i>).....	18
2. TRANSCRIPTÔMICA	18
3. REAÇÃO DA CADEIA DA POLIMERASE DA TRANSCRIÇÃO REVERSA EM TEMPO REAL.....	19
3.1 Gene de referência.....	24
3.2 Método de avaliação dos genes de referência.....	26
3.3.1 geNorm.....	26
3.2.2 BestKeeper.....	27
3.2.3 NormFinder.....	27
3.2.4 Método comparativo ΔCt	28
4. FATORES QUE PODEM INFLUENCIAR NA EXPRESSÃO GÊNICA.....	28
REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA.....	30
 CAPÍTULO 02. INVESTIGAÇÃO DE GENE DE REFERÊNCIA PARA ANÁLISE EM RCR QUANTITATIVA EM TEMPO REAL EM TECIDO DE CODORNA DE CORTE.....	36
RESUMO.....	37
ABSTRACT.....	38
INTRODUÇÃO.....	39
MATERIA E MÉTODO.....	41
RESULTADO E DISCUSSÃO.....	44
CONCLUSÃO.....	56
REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA.....	57

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO II

Tabela 1. Dados estatísticos gerados pelo programa BestKeeper para os dez genes de referência avaliados nos tecidos músculo do peito, gordura abdominal, fígado e intestino.....45

Tabela 2. Valores de estabilidade para os genes de referência classificados pelo algoritmo geNorm, NormFinder, BestKeeper e método comparativo ΔC_t para músculo do peito, gordura abdominal, fígado e intestino.....48

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I

- Figura 1.** Esquema da RT-qPCR em tempo real.....21
- Figura 2.** Fase da PCR em tempo real.....22
- Figura 3.** Curva padrão da PCR em tempo real.....23

CAPÍTULO II

- Figura 1.** Estabilidade média de expressão de acordo com os valores de estabilidade do RefFinder.....49
- Figura 2.** Classificação geral para os tecidos de codornas machos e fêmeas pelo RefFinder.....50

LISTA DE QUADRO

CAPÍTULO I

Quadro 1. Genes de referência geralmente utilizados como controle interno na reação em cadeia da polimerase da transcrição reversa em tempo real..... 26

CAPÍTULO II

Quadro 1. Sequências de nucleotídeos, tamanho do amplicon e temperatura de anelamento dos *primers* utilizados para as reações de RT-qPCR em Tempo Real..... 42

RESUMO GERAL

Sousa, F.C.B. Seleção de genes de referência para normalização da expressão gênica em tecidos de codornas. 2016. 59 páginas. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Universidade Federal do Piauí, Bom Jesus, 2016.

A coturnicultura de corte está em crescente desenvolvimento e necessita de maiores estudos no campo genético para o direcionamento produtivo. Sendo a técnica da PCR em tempo real (RT-qPCR) uma das mais importantes na análise da expressão gênica, estudos e experimentações relacionadas a seus componentes se fazem necessários. Dentre esses componentes encontra-se o gene de referência, normalizador de dados que possui impacto nos resultados e tem influência direta no sucesso da análise, devendo este possuir expressão significativa no tecido de forma invariável em todas as condições experimentais. Desse modo, objetivou-se determinar o perfil de transcritos expressos de genes de referência em tecidos sólidos de codorna de corte. Foram analisadas a estabilidade de dez genes constitutivos (ACTA1, ACTB, B2M, GAPDH, HMBS, HPRT1, SDHA, MRPS27, MRPS30 e RPL5) no músculo do peito, gordura abdominal, fígado e intestino entre os grupos macho e fêmea, a partir dos programas BestKeeper, NormFinder, geNorm e método ΔC_t , gerados pela ferramenta online RefFinder. Observou-se que o HPRT1 foi o mais estável em todos os tecidos analisados, seguindo por MRPS30 no peito, B2M na gordura abdominal, HMBS no fígado e RPL5 no intestino. Houve efeito do sexo na estabilidade dos genes testados, sendo que os genes mais estáveis para os animais machos foram: HPRT1, MRPS30, SDHA e, para fêmeas os genes RPL5, HPRT1, MRPS30. Estes resultados podem ajudar em ensaios de RT-qPCR que avaliem estes tecidos de codornas machos ou fêmeas, uma vez que fornece dados sobre quais genes são mais estáveis e podem ser testados como candidatos a genes de referência em futuras análises por RT-qPCR em condições semelhantes.

Palavras-chaves: expressão gênica, genes normalizadores, RT-qPCR

ABSTRACT GERAL

Sousa, F.C.B. Selection reference genes for normalization of gene expression in tissue's quails. 2016. 59 pages. Dissertation (Master of Animal Science) - University Federal of Piauí, Bom Jesus, 2016.

The production of meat quails for is increasing development and needs further studies in the genetic field for productive direction. As the real time PCR technique (RT-qPCR) is one of the most important in analysis of animal gene expression studies and trials related to its components are needed. Among these components is the reference gene, normalizador gene, which has great impact on the results and has direct influence on the success of the analysis, which must have significant expression in tissue invariably in all experimental conditions. Thus, the aim of this study was to evaluate reference genes for quantitative real-time PCR in European quail. There were analyzed the stability of ten constitutive genes (ACTA1, ACTB, B2M GAPDH, HMBS, HPRT1, SDHA, MRPS27, MRPS30 e RPL5) on *pectoralis* muscle, abdominal fat, liver and intestine through BestKeeper, NormFinder, geNorm programs and ΔC_t method, generated by online RefFinder tool. It was observed that the HPRT1 was the most stable in all tissues analyzed, followed by MRPS30 in *pectoralis* muscle, the B2M in abdominal fat, HMBS in the liver and RPL5 in intestine tissue. There was sex effect on the stability of the tested genes, and the most stable genes for male animals were HPRT1, MRPS30, SDHA and for females, RPL5 , HPRT1, MRPS30 genes were the most. These results may help in RT-qPCR to assess these tissues male or female quail tests, since it provides information about which genes are more stable and can be tested as candidate reference genes in future analyze by RT-qPCR under conditions like.

Keywords: gene expression, normalizador genes, RT-qPCR

INTRODUÇÃO GERAL

A importância na análise de expressão gênica tem crescido significativamente, sendo a PCR quantitativa em tempo real (RT-qPCR, do inglês *Reverse Transcription*). O método por excelência devido a sua grande eficiência e precisão (BUSTIN et al, 2009). Dois métodos de quantificação da expressão gênica são utilizados: quantificação absoluta e quantificação relativa. Na quantificação absoluta, o número absoluto de cópias de RNAm é determinado por comparação a uma curva padrão. A quantificação relativa é baseada na taxa de expressão de um gene alvo medida entre duas condições experimentais (amostra tratamento *versus* amostra controle) normalizadas para um gene de referência (PFAFFL, 2004).

Os fatores técnicos tais como a integridade e a qualidade do RNAm, variação na síntese do cDNA bem como devido a eficiência na reações da PCR podem afetar a confiabilidade dos resultados e conduzir a interpretações incorretas (BUSTIN et al., 2005). Portanto, o procedimento de normalização se faz necessário para minimizar essas variações técnicas inseridas no processo de análise da expressão genica que não seja devida unicamente ao tratamento experimental. Várias estratégias têm sido propostas para normalizar dados de quantificação relativa obtidos pela técnica de RT-qPCR, o uso de um ou mais genes de referência (ou “*housekeeping*” são também conhecidos como genes normalizadores) tem sido a estratégia mais utilizada.

Os GRs codificam para proteínas envolvidas em processos celulares básicos tais como glicólise (GAPDH), dobramento de proteínas (ciclofilina), síntese de subunidades ribossomais (rRNA), transporte e degradação de elétrons (UBC), transcrição do RNAm (fatores de transcrição), proteínas estruturais de miofibrilas (ACTB, ACTA) (CZECHOWSKI et al., 2005) são os mais utilizados. Um GR ideal deve apresentar expressão estável sob determinada condição experimental (LEE et al., 2002).

Os trabalhos tem demonstrado que o GR pode estar sob regulação de determinada condição experimental (NASCIMENTO et al., 2015; WEYRICH et al., 2010; AXTNER e SOMMER, 2009; JEMIOLO e TRAPPE, 2004). Desse modo, a estabilidade da expressão gênica do GR necessita ser avaliado previamente antes da normalização para o gene alvo, uma vez que os genes de referência utilizados não apresentam expressão estável para todas os tipos celulares ou entre as espécies que estão sendo analisadas, bem como durante várias fases do desenvolvimento e sob diferentes condições ambientais (VANDESOMPELE et al., 2002; MCCURLEY et al., 2008; PÉREZ et al., 2008; ZAROS et al., 2010).

Atualmente o guia para publicação de artigos científicos com a técnica de RT-qPCR conhecido como Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments (MIQE) tem recomendado o uso de múltiplos genes de referência no procedimento de normalização de dados de expressão genica. O uso de múltiplos GRs na normalização busca superar para possíveis limitações apresentada por um dos genes quando sob determinada condição experimental (VANDESOMPELE et al., 2002).

A coturnicultura no Brasil vem se destacando como uma atividade da avicultura industrial, pois a codorna (*Coturnix coturnix*) é considerada uma ave de fácil adaptação as condições de criação, rápido crescimento, pequeno consumo de ração e resistentes a enfermidades (BARRETO et al., 2007). Vários estudos tem avaliado a adequabilidade de RGs na normalização de gene alvo em diversas espécies de animais de produção tais como bovinos (LISOWSKI et al., 2008), suínos (MARTÍNEZ-GINER et al., 2013), ovinos (ZANG et al., 2011), cabra (NAJAFPANAH et al., 2013), cavalos (AHN et al., 2011) , frangos (NASCIMENTO et al., 2015), e peixes (YANG et al., 2013).

Embora recentes trabalhos de expressão gênica com uso de técnica de RT-qPCR têm sido relatados em codornas (Del Vesco et al., 2014; Del Vesco et al., 2016),esses autores não avaliaram previamente a estabilidade e a adequabilidade do GR sob a condição experimental testada. Para nosso conhecimento, não há estudos semelhantes avaliando a estabilidade de genes de referência adequados à normalização de dados de RT-qPCR em codornas de cortes. Além disso, estudos de transcriptômica tem se multiplicado nos últimos anos. Portanto, um melhor entendimento do perfil de expressão de genes de referência normalizadores da expressão gênica em estudos de RT-qPCR torna-se necessário. Portanto, objetivou-se determinar o perfil de transcritos expressos de genes de referência para estudos de expressão gênica por RT-qPCR em tecidos sólidos de codornas de corte.

A dissertação foi aprovada pelo comitê de ética da Universidade Federal de Sergipe. Foi estruturada conforme as normas para elaboração de dissertações do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia (PPGZ) da UFPI da seguinte forma: INTRODUÇÃO; CAPÍTULO 1. Revisão Bibliográfica elaborada de acordo com as normas do PPGZ; CAPÍTULO 2 – artigo científico intitulado: “Seleção de genes de referência para análise em PCR quantitativo em tempo real em tecidos de codornas de corte”, elaborado de acordo com as normas da Revista Pesquisa Agropecuária Brasileira; CONSIDERAÇÕES FINAIS.

CAPITULO 1. REVISÃO DE LITERATURA

Elaborada de acordo com as normas da Associação Brasileira de Normas Técnicas – ABNT

1. CODORNA EUROPEIA (*Coturnix coturnix coturnix*)

A codorna europeia (*Coturnix coturnix coturnix*) vem destacando-se como promissora para exploração doméstica. Do lado técnico-econômico, torna-se ainda mais atrativa, ao verificar seu rápido crescimento e sua elevada prolificidade e o seu pequeno consumo de ração, como um bom potencial de exploração zootécnica (CHAVES, 2013). Tendo em vista o impacto econômico da coturnicultura no Brasil, um melhor entendimento do perfil de expressão e organização genômica de genes de referência normalizadores da expressão genica em estudos de RT-qPCR é necessário.

Com o sequenciamento do genoma da galinha, houve avanços nas perspectivas para a produção animal, servindo como modelo para, aproximadamente, 9.600 espécies de aves. Possui um genoma com cerca de $1,2 \times 10^9$ pares de base (pb) e somente 11% de DNA repetitivo, facilitando o sequenciamento e a procura por genes (HILLIER et al., 2004).

Para que isso seja possível, a determinação de transcritos expressos em tecidos sólidos de codorna europeia se mostra de extrema importância, permitindo um melhor entendimento sobre a espécie além de servir de referência para estudos posteriores.

2. TRANSCRIPTÔMICA

O transcriptoma corresponde ao conjunto de transcritos expressos dentro de um determinado conjunto de células, podendo então ser associado aos genes funcionais daquela amostra, suas quantidades, em um estágio específico do desenvolvimento ou condições fisiológicas, incluindo, portanto, RNA codificante (RNAm) e não codificante (RNAr, RNAt, RNAreputatório, e outros tipos de RNAs) (WANG; GERTEIN; SNYDER, 2009).

Várias técnicas já foram desenvolvidas para caracterizar o transcriptoma completo, tanto por síntese e sequenciamento de ESTs (*Expressed Sequence Tag*) quanto, com base em hibridização com oligonucleotídeos marcadores, e o que se tem de mais novo a tecnologia de sequenciamento de nova geração. As técnicas com base em ESTs, como o SAGE (*Serial Analysis of Gene Expression*), CAGE

(*Cap Analysis of Gene Expression*) e MPSS (*Massively Parallel Signature Sequencing*), também geram dados em larga escala, mas por outro lado, é muito dispendiosa devido à necessidade de clonagem e sequenciamento, e não são capazes de distinguir isoformas de um mesmo transcrito (WANG;GERTEIN;SNYDER, 2009).

Outra tecnologia é o sequenciamento de nova geração com o desenvolvimento específico aplicado para a síntese e sequenciamento de cDNA em larga escala. Esta técnica se tornou importante, pois a interpretação da sequência expressa tem possibilitado não somente a nível celular como também uma visão global de transcritos. Sendo que a detecção dos transcritos não fica restrita somente àqueles correspondentes a uma sequência genômica pré-existente, tornando o método atrativo para a pesquisa em organismos cujos genomas ainda não foram determinados (GILBERT et al., 2008).

A tecnologia de microarranjo é uma eficiente ferramenta para determinação de um amplo padrão de expressão gênica em larga escala (HINTON et al., 2004). Entretanto, essa técnica exige algumas limitações no uso como: necessidade de conhecimento prévio do genoma, a hibridização correta dos fragmentos, especificidade do arranjo para cada isolado e baixa acurácia na captação do sinal fluorescente (BLOOM et al., 2009). Uma etapa fundamental da análise de resultados dos microarranjos consiste na validação dos dados de expressão gênica. Esta validação é realizada pela utilização da técnica conhecida por RT-qPCR.

A utilização da técnica PCR em tempo real é uma eficiente ferramenta de quantificação molecular, visto que, permite quantificar número de cópias (cDNA) da sequência alvo, é possível a análise comparativa entre o número de cópias desse molde de DNA e a quantidade de RNAm que permite análises globais da expressão (BENDERS et al., 2005; SCHMID et al.,2005).

3. REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE DA TRANSCRIÇÃO REVERSA EM TEMPO REAL (RT-qPCR)

A técnica da reação em cadeia da polimerase da transcrição reversa em tempo real (RT-qPCR) foi descrita pela primeira vez em 1993, por HIGUCHI e seus colaboradores. Esta técnica tem como base o processo de transcrição reversa (RT) seguida da reação em cadeia da DNA-polimerase (PCR) que permite amplificar ácidos nucleicos e quantificar o DNA obtido com a marcação de

moléculas fluorescentes covalentemente ligadas aos nucleotídeos dos *amplicons* sintetizados, as quais podem ser quantificadas durante a cinética da reação (em “tempo real”) (BUSTIN, 2010).

Os produtos formados são monitorados a cada ciclo da reação, o que permite uma detecção rápida e precisa do cDNA amplificado (GACHON et al., 2004). Os dados são coletados da PCR com amplificação e detecção em tempo real, através da captação da fluorescência proporcional a quantidade de produtos amplificados, além de maior sensibilidade e especificidade na análise de transcritos (HIGUCHI et al.,1993). Outras características positivas da RT-qPCR são resultados de quantificação rápida e alta acurácia (HIGUCHI et al.,1993).O uso da técnica da RT-qPCR é empregada no campo da biologia principalmente em situações que a quantidade de DNA disponível é limitada, utilizada na medicina forense, detecção de mutações, preparação de fragmentos de DNA para clonagem, sequenciamento e, principalmente, em análises de expressão gênica (GARCÍA et al., 2007).

Na reação da PCR em tempo real alguns componentes são essenciais para dar início à reação, sendo eles tampão, cátion bivalente - Mg^{2+} e cátion monovalente - K^{+} desoxirribonucleotídeos trifosfato (dNTP's), DNA polimerase termoestável (Taq polimerase) e oligonucleotídeos iniciadores específicos (“*primers*”) que se ligam às extremidades 5' e 3' de uma determinada região do genoma a ser amplificada. A reação é baseada na incubação em vários ciclos constituídos essencialmente por 3 fases: 1) desnaturação (92 °C) do DNA da amostra, 2) anelamento (50 – 60 °C) dos oligonucleotídeos iniciadores ao DNA desnaturado e 3) extensão (72 °C) das cadeias de DNA a partir de cada um dos iniciadores e sob a catálise da enzima Taq DNA Polimerase (LADEIRA et al., 2011).

As três etapas constituem um ciclo da PCR, sendo que ao final de cada ciclo se originam duas novas cadeias de DNA para cada alvo da cadeia dupla, dessa forma tem se um crescimento exponencial (DELIDOW et al., 1993). Um esquema do processo pode ser visto na Figura 1.

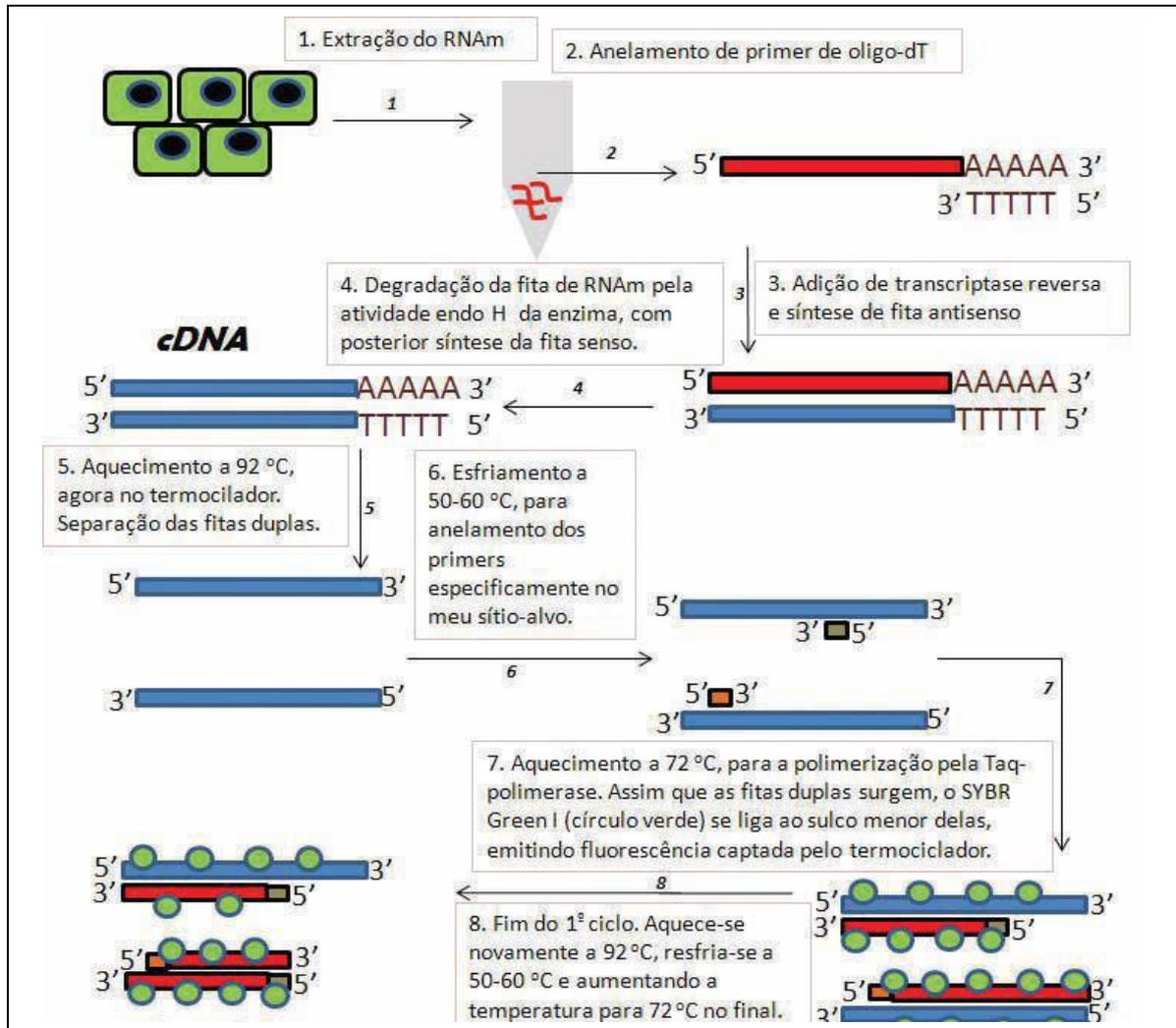


Figura 1. Esquema da Reação em Cadeia da polimerase da transcrição reversa em tempo real (FONTE: Oliveira, 2010).

A detecção do aumento do produto de qPCR ao longo de cada ciclo é possível em virtude de utilizar reagentes fluorescentes que possibilitam a detecção da formação do produto da PCR. Esses reagentes podem ser de dois tipos: uma sonda específica que reconhece sequências do genoma (*TaqMan*); ou um corante fluorescente que apresenta alta afinidade ao DNA dupla-fita, ligando-se a qualquer sequência amplificada (*SYBR Green*). Essa ligação reagente-*amplicon* faz com que

aumente a fluorescência e permite detectar o produto da qPCR conforme este se acumula durante os ciclos da reação (HUGGETT et al., 2005).

É possível identificar três fases no gráfico que é gerado na RT-qPCR de acordo com a quantidade de produto amplificado, modulada pelos sinais de fluorescência, a fase de crescimento exponencial, fase de crescimento linear ou logarítmica e fase estacionária (KUBISTA et al., 2006) (Figura 2).

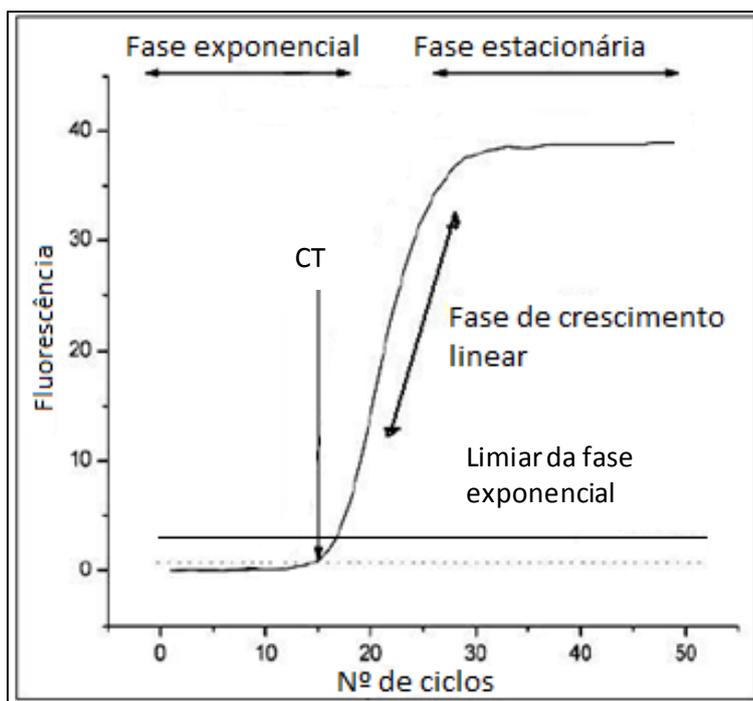


Figura 2. Fases da PCR em tempo real (adaptada de Kubista et al., 2006)

A fase de crescimento exponencial é considerada a melhor, já que compreende a detecção precoce de sinais de fluorescência durante a reação de PCR onde a determinação ocorre até a taxa exponencial máxima, resultando na determinação do ciclo de quantificação (HEID et al., 1996). Há um ponto onde a reação atinge o limiar da fase exponencial. Este ponto corresponde número de ciclos necessários para atingir e ultrapassar o limiar da fase exponencial por meio da fluorescência detectada chamado de ponto Ct (cycle threshold) (HEID et al., 1996; NICKLAS; BUEL, 2003; KUBISTA et al., 2006). Na fase de crescimento linear, a eficiência da amplificação inicia a queda até a fase estacionária, onde a amplificação cessa rapidamente até o ciclo final (SHIPLEY et al., 2006).

Existem dois métodos para a quantificação utilizando a RT-qPCR em tempo real: a quantificação absoluta e a quantificação relativa. O método de quantificação absoluta o número de cópias de um gene é determinado pela comparação dos dados

obtidos para uma amostra com uma curva de calibração gerada a partir de reações com diluições sucessivas da amostra. A quantificação relativa é baseada na taxa de expressão de um gene alvo medida entre duas condições experimentais (amostra tratamento *versus* amostra controle) normalizadas para um gene de referencia (PFAFFL, 2004).

A agilidade, praticidade e confiança nos dados levam ao uso da RT-qPCR em grande escala, no entanto, diversos fatores podem interferir no desempenho desta técnica (PFAFFL, 2009). Nesse sentido, o uso correto da eficiência de amplificação e da normalização é de grande importância, permitindo resultados mais confiáveis ao final da expressão gênica relativa.

A eficiência de amplificação é importante no processo da quantificação da expressão gênica, uma vez que essa eficiência tem como base que os produtos da PCR dobram a cada ciclo de amplificação. O valor da eficiência deve ser de aproximadamente 2 significando a duplicação do material genômico e correspondendo a 100% de eficiência (RUTLEDGE; CÔTÉ, 2003).

Existem diversos métodos disponíveis para calcular a eficiência de amplificação, mas o método mais acurado e que fornece eficiências mais precisas e realistas deve ser definido através de análises prévias para cada experimento em particular (PFAFFL, 2009). O método da curva padrão determina a eficiência de amplificação a partir de uma série de diluições de cDNA. Nesse método o valor da eficiência é determinado a partir da inclinação da curva padrão (CIROS et al.,2007; RASMUSSEN et al.,2001) (Figura 3).

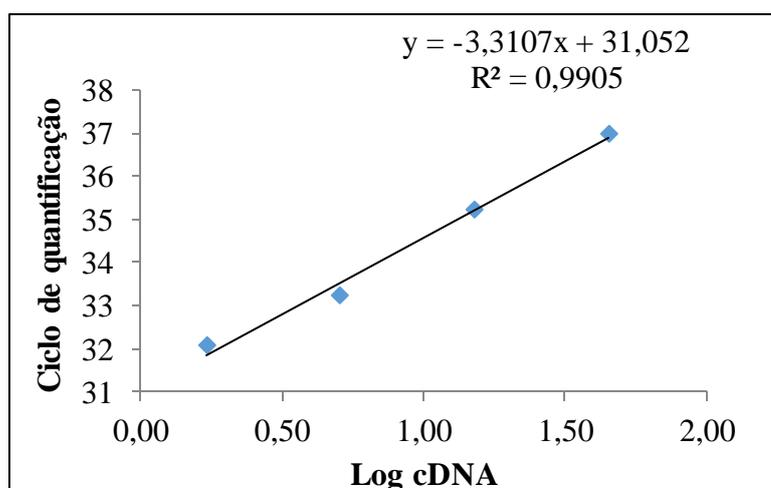


Figura 3. Curva padrão de PCR em tempo real (Arquivo pessoal)

O *slope* (inclinação) da reta é comumente usado para estimar a eficiência da amplificação, sendo que quando o declive da curva padrão apresenta valor de -3,32, a eficiência da reação é de 100%. Ao passo que, valores abaixo de -3,32 indicam reações com menos de 100% de eficiência (SZABO et al., 2004).

A normalização através do uso de genes referência funciona com um controle interno do erro experimental inerente a técnica de RT-qPCR que estão sujeitos às variações provenientes de todo o processo, desde a integridade e a qualidade do RNAm, variação na taxa da enzima transcriptase reversa durante a síntese do cDNA, quantidade diferentes de cDNA entre replicas técnicas e biológicas bem como devido as eficiências na reações da PCR que podem afetar a confiabilidade do resultados e conduzir a interpretações incorretas (BUSTIN et al., 2009 ; MALLONA et al., 2010) . Portanto, o procedimento de normalização se faz necessário para minimizar essas variações técnicas inseridas no processo de análise da expressão genica que não seja devida unicamente ao tratamento experimental.

Dois métodos são utilizados para a quantificação, o método da curva padrão relativa e o método Ct comparativo. Para a quantificação absoluta, que tem como objetivo determinar o número exato de moléculas de DNA utiliza-se o método da curva padrão ou outros métodos que utilizam derivadas secundárias (MA et al., 2006; PELT-VERKUIL et al., 2008).

Já na quantificação relativa o método $\Delta\Delta C_t$ é o mais utilizado, consiste na comparação dos valores de normalização com os valores de Ct da amostra e do controle normalizados a um gene endógeno apropriado. Este método também é conhecido como o método $2^{-\Delta\Delta C_t}$, onde $\Delta\Delta C_t$ é igual ao ΔC_t amostra menos ΔC_t referência, sendo que nesta equação ΔC_t amostra é o valor de Ct para a amostra que está sendo analisada e normalizada ao gene apropriado, e ΔC_t referência é o valor de Ct para o controle normalizador também ao gene apropriado, o número 2 como base no cálculo é devido ao crescimento exponencial que se dá a cada ciclo, sendo que, numa eficiência de amplificação de 100% o número de cópias aumenta nessa proporção (2^n , onde n é o número de ciclos) (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001).

3.1 Gene de referência

Os genes de referência são utilizados como controle interno da reação que têm sequências diferentes do gene alvo (o que se pretende analisar). GRs

codificam para proteínas envolvidas em processos celulares básicos tais como glicólise (GAPDH), dobramento de proteínas (ciclofilina), síntese de subunidades ribossomais (rRNA), transporte e degradação de elétrons (UBC) (YU et al., 2008; KOUZAKI et al., 2009; TANG et al., 2009). Dentre os genes de referência mais utilizados destaca o gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) devido a vários trabalhos utilizados este gene, tornando o mesmo clássico como escolha em controle endógeno (KOZARA;RAPAC, 2013).

Os estudos envolvendo a escolha de gene de referência para tecidos de suínos apresentaram resultados divergentes para expressão do GAPDH nos tecidos analisados (DE KETELACRE et al., 2006). Diferindo estes resultados BOGAERT et al (2006) analisando genes de referência para tecido em pele de equino observaram que o GAPDH foi o que se apresentou mais estável. O que corrobora para uma necessidade de validação do mesmo quando se pretende utilizar como gene de referência (BROWNING et al.,2012).

Para que um gene seja considerado candidato a gene de referência de determinado estudo, este deve possuir alguns pré-requisitos básicos como: ter expressão em abundância, não ser co-rregulado com o gene alvo e apresentar variação de expressão mínima (CHERVONEVA et al., 2010; LEE et al. 2002). Trabalhos tem demonstrado que estes GR podem não apresentar expressão estável para todas as células do organismo ou entre as espécies que estão sendo analisadas, bem como durante várias fases do desenvolvimento e sob diferentes condições experimentais (NASCIMENTO et al., 2015; WEYRICH et al. 2010; MCCURLEY et al., 2008; PÉREZ et al., 2008; ZAROS et al., 2010).

Logo o guia para publicação de artigos científicos com a técnica de RT-qPCR conhecido como Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments (MIQE) tem recomendado o uso de múltiplos genes de referencia no procedimento de normalização de dados de expressão genica. O uso de múltiplos GRs na normalização busca superar possíveis limitações apresentada por um dos genes quando sob determinada condição experimental (VANDESOMPELE et al., 2002). Alguns dos genes geralmente utilizados em estudos de expressão gênica estão apresentados no Quadro 1.

Quadro 1. Genes de referência geralmente utilizados como controle interno na Reação em cadeia da polimerase da transcrição reversa em tempo real.

Gene	Descrição
GAPDH	Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase
MPR27	Proteína ribossomal S27
ACTB	Beta-actina
MPR30	Proteína ribossomal S30
EEF1	Fator de alongação traducional eucariótico-1
HMBS	Hidroximetilbilano sintase
TFRC	Receptor da transferrina (p90, CD71)
RPL5	Proteína ribossomal L5
SDHA	Complexo desidrogenase de succinato, subunidade A
UBC	Ubiquitina C
B2M	Beta-2-Microglobulina
ACTA1	Alfa-actina 1
HPRT1	Hipoxantina fosforibosiltransferase 1
18S e 28S	Subunidade ribossomais

3.2 Métodos de avaliação dos genes de referência

Tendo em vista a necessidade de validar a estabilidade de expressão de genes candidatos a controle vários algoritmos foram desenvolvidos nos últimos anos, dentre eles aqueles usados nos programas geNorm, NormFinder, BestKeeper e o método comparativo de Ct.

3.2.1 geNorm

O programa geNorm é software desenvolvido por VANDESOMPELE et al. (2002). Este programa identifica dois genes de referência ou a combinação múltipla de vários genes dentro de um conjunto de tecidos e possibilita a escolha do gene mais estável. Calcula um fator de normalização com base nos níveis de expressão do melhor gene. Para todos os genes, e calculado a variação aos pares, analisando a variação da expressão dois a dois, de todas as combinações gênicas.

Para a análise da estabilidade, o geNorm classifica os genes a partir da sua estabilidade de expressão média (M), sendo que esse valor deve situar-se abaixo de 1,5 para que o gene seja considerado estável. Analisa a variação da média geométrica dos valores de expressão de genes candidatos a gene referência, obtidos na quantificação por PCR em tempo real.

3.2.2 BestKeeper

O programa BestKeeper é um software desenvolvido por PFAFFL et al. (2004). O programa determina os melhores genes normalizadores utilizando os valores do desvio padrão e coeficiente de variação. A partir destes dados, é calculada a variância do coeficiente de correlação de Pearson de expressão, a qual é utilizada para a análise de correlação pareada entre os genes, sendo considerado o melhor normalizador, o gene com menor variação. O programa usa os valores de Ct em vez de quantidades relativas e tem por base a derivação padrão que deve situar-se abaixo de um (<1).

Como característica positiva deste *software*, existe o fato do mesmo ser capaz de analisar até 10 genes de referência em contraste ao *software* geNorm descrito anteriormente. Isso se deve ao fato de o índice aplicado ser robusto, o que torna possível a aplicação do resultado como uma expressão padrão, como se fosse um único gene. Além disso, para o processamento subsequente, o conjunto desses dados podem ser importados para outras ferramentas de *softwares* como o REST (PFAFFL et al., 2002), geNorm (VANDESOMPELE et al., 2002) ou Q-Gene (MULLER et al., 2002).

3.2.3 NormFinder

NormFinder é uma ferramenta aplicada pelo Microsoft Excel que identifica o melhor gene normalizador entre um grupo de genes candidatos com base em sua estabilidade de expressão. Este algoritmo avalia a variação total de expressão dos genes candidatos através da soma da variância. O programa também calcula os valores de estabilidade para os genes candidatos organizados em escala decrescente, sendo que um menor valor indica uma alta estabilidade de expressão (ANDERSEN et al. (2004).

3.2.4 Método Δ Ct

O método de delta Ct comparativo (Δ Ct) avalia os genes de referência mais estáveis por meio da comparação da expressão relativa de pares de genes dentro de cada amostra de tecido. Quando o valor de Δ Ct entre os pares de genes permanece constante para todas as amostras testadas, significa que esses genes de referência são expressos de forma estável entre as amostras ou co-regulados, se o Δ Ct oscila, isso quer dizer que um ou ambos os genes são expressos de forma variável (SILVER et al., 2006)

A análise por pares permite a introdução de um terceiro, quarto ou quinto gene, após as falhas, para a comparação entre os pares que irão fornecer a maior estabilidade. Sendo assim, estes genes podem ser classificados os descartados apresenta como vantagem a possibilidade de que vários genes sejam testados e comparados uns com os outros com base no Δ Ct.

4. FATORES QUE PODEM INFLUENCIAR NA EXPRESSÃO GÊNICA

Nos organismos eucariotos, existem genes que se expressam apenas em determinados tecidos e esses são chamados de genes tecido-específicos e estão sob regulação tecido-específica. No entanto, existem também genes que se expressam somente durante determinados períodos e, estes são controlados por meio de regulação temporal (LEHNINGER et al., 2000). Assim, diferentes tecidos apresentam componentes proteicos e estruturais também diferentes, resultando em um perfil de expressão gênica específico, adequado a cada necessidade (PERFITO et al., 2012).

Segundo JEMIOLO e TRAPPE (2004), ao avaliar os níveis de expressão dos genes B2M, GAPDH, 18S e ACTB em fibras musculares e em diferentes condições fisiológicas, observaram diferença nas quantidades de transcritos podendo chegar a 52 vezes mais para o gene B2M, em relação ao tecido antes do exercício e 4h depois. De acordo com BUSTIN et al (2010), é evidente que células geneticamente idênticas, expostas ao ambiente uniforme mostram variação significativa na quantidade de RNAm devido à diferente localização física. VANDESOMPELE et al (2002) analisado 10 genes em tecidos de neuroblastoma, fibroblastos, leucócitos e ossos constataram que em cada tecido a ordem de expressão dos genes foi variável e dentro de um mesmo tecido também, o nível de expressão do gene foi maior que o nível do menos expresso, sugerindo que a

variabilidade de expressão ocorre não somente intertecidual, como dentro de uma classe de tecido.

A espécie também pode influenciar na expressão do gene, já que a estrutura do DNA e o modo como a informação é codificada pelos genes e convertida em diferentes proteínas pode explicar essa diferença. Alguns estudos confirmam essa diferença, como BOGAERT et al (2006) analisando genes de referência para tecido em pele de equino observaram que o GAPDH foi o que se apresentou mais estável; diferentemente deste resultado DE KETELAERE et al (2006), analisando a expressão de seis genes de referência em tecidos de suínos, observaram que o GAPDH foi o menos estável.

O sexo pode alterar a expressão gênica e, as condições fisiológicas inerentes ao organismo, por apresentar particularidades no seu metabolismo, ativando e desativando proteínas específicas, resultam de diferenças na regulação gênica e comprovando tais questões sobre expressão diferencial em machos e fêmeas, MCCURLEY; CALLARD (2008) ao analisarem a expressão de genes constitutivos no sexo e tipo de tecidos em peixe zebrafish observou diferença na expressão do TBP e GAPDH no músculo esquelético e cardíaco, onde a maior expressão foi nas fêmeas que nos machos. Diferenças também foram observadas em cinco genes (ACTB, GAPDH, G6PD, TBP, B2M) quando comparada no ovário e testículos (MCCURLEY; CALLARD 2008).

MO et al. (2014) constataram que sete genes comumente utilizados como genes de referência (ACTB, B2M, EEF1, GAPDH, TUBA, RPL8 e GAPDH), apresentaram variabilidade significativa entre machos e fêmeas, quando testados no hepatopâncreas de peixes. Enquanto ZINZOW-KRAMER et al. (2014) constataram que a normalização para os genes GAPDH e PIA juntos, foi capaz de detectar diferença entre sexos para aves canoras. Assim como na normalização para os genes GAPDH, RPL32, ACTB e 18S individualmente, mostrou diferença significativa na expressão gênica entre machos e fêmeas.

Há necessidade de avaliar as diferenças na expressão gênica de determinado tecido, espécies e sexos são importantes, visto que existe diferença na expressão dos genes, essas diferenças podem ser observadas, a partir da utilização de genes de referência adequados, previamente testados, o que reforça a importância de estudos à cerca dos genes endógenos (SUZUKI et al., 2000).

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

- AHN ,K.; Jin-Han, B.; Kyu-Hwi, N.; Chong-Eon ,L .; Kyung-Do, P.; Hak-Kyo, L.; Byung-Wook, C .; Heui-Soo, K.; Identification of reference genes for normalization of gene expression in thoroughbred and Jeju native horse (Jeju pony) tissues. **Genes & Genomics**. v. 3, p. 245-250, 2011.
- ANDERSEN, C. L.; JENSEN, J. L.; ORNTOFT, T. F. Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: A model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. **Cancer Research**. v. 64, s/n. p. 5245–5250, 2004.
- AXTNER, J.; SOMMER, S. Validation of internal reference genes for quantitative real-time PCR in a non-model organism, the yellow-necked mouse, *Apodemus flavicollis*. **BMC Research Notes**. v.2, n. 264, p.1-7, 2009.
- BARRETE, T. L.S.; QUIRINO, B.J.S.; BRITO,C.D.; UMIGI, R.T.; ARAÚJO, M.S.; COIMBRA, J.R.S.; ROJAS, G.E.E.; FREITAS, F.F.J.; REIS, S.R. Níveis de energia metabolizável para codorna japonesa na fase inicial de postura. *Revista Brasileira de Zootecnia*. v. 36,n.1,p.79-85, 2007.
- BENDERS, G. A.; POWELL, B. C.; HUTCHISON, C. A. III. Transcriptional analysis of the conserved *ftsZ* gene cluster in *Mycoplasma genitalium* and *Mycoplasma pneumoniae*. **Journal of Bacteriology**, v.187, p.4542-4551, 2005.
- BLOOM, J.S.; KRUGLYAK, L.; SINGH, M.; CAUDY, A.A. MEASURING. Differention gene expression by short read sequencing: Quantitative comparison to channel expression microarrays. **BMC Genomics**. v.10, p. 221, 2009.
- BOGAERT, L.; VAN P.M.; DE B.C.; PEELMAN, L.; GASTHUYS, F.; MARTENS, A. Selection of a set of reliable reference genes for quantitative realtime realtime PCR in normal equine skin and in equine sarcoids. **BMC Biotechnology**bbbbbb. v. 6, n. 24, p. 1-7, 2006.
- BROWNING, R.; ADAMSOM, S.; KARIM, S. Choice of a stable set of reference genes for qRT-PCR analysis in *Amblyomma maculatum* (Acari:Ixodidae). **Journal Medical Entomology**. v.49, n.6, p. 1939-1346,2012.
- BUSTIN, S. A. Why the need for qPCR publication guidelines. The case for MIQE. **Methods**. v. 50, n. 4, p. 217–226, 2010.
- BUSTIN, S. A.; BENES. V.; GARSON, J. A.The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. **Clinical Chemistry**, v. 55, p. 611-622, 2009.
- BUSTIN, S. A.; YAKOVLEV, I. A.; STRAUSS, S. H. Validating internal controls for quantitative plant gene expression studies. **BMC Plant Biology**, v. 4, p. 14, 2005.

- CHAVES, L. **Setor Agropecuário**. 2013. Disponível em: <<http://www.caprino-ovinocultura.com.br/>>. Acesso em: 17 janeiro. 2016.
- CHERVONEVA, I.; LI, Y.; SCHULZ, S. Selection of optimal reference genes for normalization in quantitative RT-PCR. **BMC Bioinformatics**. v. 11, n. 253, p. 1-15, 2010.
- CIKOS, S.; BUKOVSKÁ, A.; KOPPEL, J. Relative quantification of mRNA: comparison of methods currently used for real-time PCR data analysis. **BMC Molecular Biology**, London, v. 20, p. 8-13, 2007.
- DE KETELAERE, A.; GOOSSENS, K.; PEELMAN, L.; BURVENICH, C. Technical note: validation of internal control genes for gene expression analysis in bovine polymorphonuclear leukocytes. **Journal Dairy Science**. v.89, n.10, p.4066-4069, 2006.
- DEL VESCO, A. P.; GASPARINO, E. ; ZANCANELA, V. ; GRIESER, D. O. ; STANQUEVIS, C. E. ; POZZA, P. C. ; OLIVEIRA NETO, A. R. . Effects of selenium supplementation on the oxidative state of acute heat stress-exposed quails. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition** (1986), p. n/a-n/a, 2016.
- DEL VESCO, A. P.; GASPARINO, E. ; GRIESER, D. O. ; ZANCANELA, V. ; GASPARINO, F. R. S. ; CONSTANTIN, J. ; OLIVEIRA NETO, A. R. . Effects of methionine supplementation on the redox state of acute heat stress-exposed quails. **Journal of Animal Science**. v. 92, p. 806-815, 2014.
- DELIDOW, B.C.; LYNCH, J.P.; PELUSO, J.J.,; WHITE, B.A. PCR protocols: current methods and applications. **Edition A White**. Totowa, NJ, p. 2, 1993.
- GACHON, C.; MINGAN, A.; CHARRIER, B. Real time PCR: what relevance to plant studies? **Jornal of experimental Botany**. v. 55, p. 1445-1454, 2004.
- GARCÍA, A.R.; PRIETO, V.R.; ZUNZUNEGUI, D.K. Aplicación de la RT-PCR en tiempo real para el diagnóstico de PRRS. **Revista Complutense de Ciências Veterinárias**. v. 1, n.2, p. 646-653, 2007.
- GILBERT, J.A.; FIELD, D.; HUANG, Y.; EDWARDS, R.; LI, W.; GILNA, P.; JOINT, I. Detection of large numbers of novel sequences in the metatranscriptomes of complex marine microbial communities. **Plos One**. v. 3, p.30-42, 2008.
- HEID, C. A.; STEVENS, J.; LIVAK, K. J.; WILLIAMS, P. M. Real time quantitative PCR. **Genome Research**. v. 6, n.10, p. 986-994, 1996.
- HIGUCHI, R.; DOLLINGER, G.; WALSH, P.S.; GRIFFITH, R. Real-time monitoring of DNA amplification reactions. **BioTechnology**. v. 11, p. 1026–1030, 1993.
- HILLIER, L. W. et al. Sequence and comparative analysis of the chicken genome provide unique perspectives on vertebrate evolution. **Nature**, v. 432, n. 7018, p. 695–716, 2004.

- HINTON, J. C.; HAUTEFORT, I.; ERIKSSON, S.; THOMPSON, A.; RHEN, M. Benefits of using microarrays to monitor bacterial gene expression during infection. **Current Opinion in Microbiology**. v. 7, p. 277-282, 2004.
- HUGGETT, J.; DHEDA, K.; BUSTIN, S.; ZUMLA, A. Real-time RT-PCR normalization; strategies and considerations. **Gene and Immunity**. v. 6, p. 279-284, 2005.
- JEMIOLO, B; TRAPPE, S. Single muscle fiber gene expression in human skeletal muscle: validation of internal control with exercise. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. v. 320, n.3 p.1043–1050, 2004.
- KOUZAKI, H.; O'GRADY, S.M.; LAWRENCE, C. B.; KITA, H. Proteases induce production of thymic stromal lymphopoietin by airway epithelial cells through protease-activated receptor-2. **The Journal of Immunology**. v. 183, p.1427, 2009.
- KOZERA, B; RAPACZ, M. Reference genes in real-time PCR. **Journal of Applied Genetics**. v. 54, n. 4, p. 391 – 406, 2013.
- KUBISTA, M.; ANDRADE, J. M.; BENGTSSON, M. The real-time polymerase chain reaction. **Molecular Aspects of Medicine**, v.27, s/n, p. 95–125, 2006.
- LADEIRA, P. R. S.; ISAAC, C.; FERREIRA, M. C. Reação em cadeia da polimerase da transcrição reversa em tempo real. **Revista Medicina**. v. 90, n. 1, p. 47-51, 2011.
- LEE, P. D.; SLADEK, R.; GREENWOOD, C. M; HUDSON, T. J. Control genes and variability: absence of ubiquitous reference transcripts in diverse mammalian expression studies. **Genome Research**.v. 12, p.292–297, 2002.
- LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Principles of Biochemistry**. 3^a Edition, Worth Publitions, 2000.
- LISOWSKI, P.; PIERZCHAŁA, M.; GOŚCIK, J.; PAREEK C. S.; ZWIERZCHOWSKI L. Evaluation of reference genes for studies of gene expression in the bovine liver, kidney, pituitary, and thyroid. **Journal of Applied Genetics**. v. 49, p. 367-372. 2008.
- LIVAK, J.K.; SCHMITTGEN, D.T. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2- Δ Ct Method. **Methods**, v.25, p.402-408, 2001.
- MA, H; KUAN-JIUNN, S.; CHEN, G. Application of Real-time Polymerase Chain Reaction (RT-PCR). **The Journal of American Science**, v. 2, s/n, p. 1-15, 2006.
- MALLONA, I.; LISCHEWSKI, S.; WEISS, J.; HAUSE, B.; EGEEA-CORTINES, M. Validation of reference genes for quantitative real time PCR during leaf and flower development in *Pentunia* hybrid. **Research Artiche**. v. 10, n. 4, p. 1-11, 2010.
- MARTÍNEZ-GINER, M.; NOGUERA, J.L, BALCELLS, I.; FERNÁNDEZ-RODRÍGUEZ, A.; PENA, R.N. Selection of Internal Control Genes for Real-Time Quantitative PCR in Ovary and Uterus of Sows across Pregnancy. **PLoS ONE**. v. 8, n. 6, p.1-9, 2013.

- McCURLEY, A. T.; CALLARD, G. V. Characterization of housekeeping genes in zebrafish: male-female differences and effects of tissue type, developmental stage and chemical treatment. **BMC molecular Biology**, v. 9, n. 102, p. 1-12, 2008.
- MO, F.; ZHAO, J.; LIU, N. Validation of reference genes for RT-qPCR analysis of CYP4T expression in crucian carp. **Genetics and Molecular Biology**, v. 37, n. 2, p. 500-507, 2014.
- MULLER, P. Y.; JANOVJAK, H.; MISEREZ, A. R. Processing of Gene Expression Data Generated by Quantitative Real-Time RT-PCR. **BioTechniques**, v. 32, n. 6, p. 1-7, 2002.
- NAJAFPANAH, M. J.; SADEGHI, M.; BAKHTIARIZADEH, M.R.; Reference Genes Selection for Quantitative Real-Time PCR Using RankAggreg Method in Different Tissues of Capra hircus. **PLoS ONE** .v. 8, n.12, p. 1-10, 2013.
- NASCIMENTO, C.S.; BARBOSA, L.T.; BRITO, C.; FERNANDES, R.P.M.; MANN, R.S.; PINTO, A.P.G.; OLIVEIRA.H.C.; DODSON, M.V.; GUIMARÃES, S.E.F.; DUARTE, M.S. Identification of suitable reference genes for real time quantitative polymerase chain reaction assays on pectoralis major muscle in chicken (*Gallus gallus*). **PLOS one**, v. 10, n. 5, p.1-15, 2015.
- NICKLAS, J. A.; BUEL, E. Development of an Alu-based, QSY 7-labeled primer PCR method for quantitation of human DNA in forensic samples. **Journal Forensic Sciences**. v. 48, n. 2 p.282-291, 2003.
- OLIVEIRA, T. M. S. **PCR em Tempo real: métodos e aplicações**. 2010. 111 f. dissertação (Mestrado em Toxicologia e Ecotoxicologia) - Faculdade de Biologia, Universidade de Aveiro, Portugal.
- PELT-VERKUIL, E.; VAN BELKUM, A.; HAYS, J.P. Principles and technical aspects of PCR amplification. **Springer**, p.1-7, 2008.
- PÉREZ, R.; TUPAC-YUPANQUI, I.; DUNNER, S. Evaluation of suitable reference genes for gene expression studies in bovine muscular tissue. **BMC Molecular Biology**. London, v. 11, p. 69-79, 2008.
- PERFITO. N.; JEONG. S.Y.; SILVERIN. B.; CALISI. R.M.; BENTLEY. G.E.; HAU. M. Anticipating spring: wild populations of great tits (*Parus major*) differ in expression of key genes for photoperiodic time measurement. **PloS One**, v.7, n. 34, p. 997, 2012.
- PFAFFL, M. W.; GRAHAM, W. H.; DEMPFLER, L. Relative expression software tool (REST©) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. **Nucleic Acids Research**, V. 30, n. 9, p. 1-10, 2002.
- PFAFFL, M. W.; TICHOPAD, A.; PRGOMET, C. Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper-excel-based tool using pair-wise correlations. **Biotechnology Letters**. v.26, p. 509–515, 2004.

- PFAFFL, M.W. Relative quantification. DORAK, T. (Ed.). **Real-time PCR**. Published by International University Line. p. 63-82. 2009.
- RASMUSSEN, R. Quantification on the LightCycler. In MEUER, S., WITTER, C.,; NAKAGAWARA, K. (Ed.). **Rapid cycle Real time PCR, Methods and applications**. Heidelberg,:Springer Press. 2001. p. 21:34.
- RUTLEDGE, R.G.; CÔTÉ, C. Mathematics of quantitative PCR and the applications of standard curves. **Nucleic Acids Research**. v. 31, n. 6, p.93, 2003.
- SCHMID, A.K.; HOWELL, H.A.; BATTISTA, J.R.; PETERSON, S.N.; LIDSTRO. M. M.E. Global transcriptional and proteomic analysis of the Sig1 heat shock regulon of *Deinococcus radiodurans*. **Journal of Bacteriology**. v.187, p.3339-3351, 2005.
- SILVER, N.; BEST, S.; JIANG, J. Selection of housekeeping genes for genes expression studies in human reticulocytes using real time PCR. **BMC Molecular Biology**. v. 7, s/n, p. 1-7, 2006.
- SHIPLEY, G.L.; DORAK, M.T. **An introduction to real-time PCR** (Ed). Taylor; Francis Group, p.1-31, 2006.
- SUZURI, T.; HIGGINS, P. J.; CROWFORD. Control selection for RNA quantitation. **Biotechniques**, v. 29, p. 332–337, 2000.
- SZABO, A.; PEROU, C.M.; KARACA, M.; PERREARD, L.; PALAIS, R.; QUACKENBUSH, J.F.; BERNARD, P.S. Statistical modeling for selecting housekeeper genes. **Genome Biology**. v. 5, n. 8, p. 49-59, 2004.
- TONG, Z.; GAO, Z.; WANG, F.; ZHOU, J.; ZHANG, Z. Selection of reliable reference genes for gene expression studies in peach using real-time PCR. **BMC Molecular Biology**. v. 10, n. 71, p.1-13, 2009.
- WANG, Z.; GESTEIN, M.; SNYDER, M. RNA-seq: A revolutionary tool for transcriptomics. **Nature Reviews Genetics**, v.10, p.57-63, 2009.
- WEYRICH , A.; AXTNER , J.; SOMMER ,S. Selection and validation of reference genes for realtime RT-PCR studies in the non-model species *Delomys sublineatus* , an endemic Brazilian rodent. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. v.392, n.5, p.145–149. 2010.
- YANG , C.G.; WANG, X. L.; TIAN, J.; LIU, W.; WU, F.; JIANG, M.; WEN, H.; Evaluation of reference genes for quantitative real-time RT-PCR analysis of gene expression in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Gene**. v.527, n. 1, p. 183-92, 2013.
- YU, Q.; HOU, S.; FELTUS, F. A.; JONES, M. R.; MURRAY, J.E.; VEATCH, O.; LEMKE, C.; SAW, J. H.; MOORE, R. C.; THIMMAPURAM, J.; MOORE, P.H.; ALAM, M.; JIANQ, J.; PATERSON, A.H.; MING, R. Low X/Y divergence in four pairs of papaya sex-linked genes. **The Plant Journal**. v.53, n.1, p. 124– 132, 2008.

ZANG, R .; BAI J.; XU, H.; Zhang, L.; Yang, J.; Yang ,L.; Lu, J.; Wu, J. Selection of suitable reference genes for real-time quantitative PCR studies in Lanzhou fat-tailed sheep (*Ovis ares*). **Asian Journal of Animal and Veterinary Advances Year.** v. 6, n. 8, p.789 – 804, 2011.

ZAROS, L.G.; COUTINHO, L.L.; SIDER, L.H.; HENRIQUE, R. M.; NEVES, M.R.M.; BENVENUTI, C. L.; NAVARRO, A. M.C.; VIEIRA, L.S. Evaluation of reference genes for real-time PCR studies of Brazilian Somalis sheep infected by gastrointestinal nematodes. **Genetics Molecular Biology.** v. 33, n.3, p.486-490, 2010.

ZINZOW-KRAMER, W. M.; HORTON, B. M.; MANEY, D. L. Evaluation of Reference Genes for Quantitative Real-Time PCR in Songbirds. **Hormones and Behavior.** v. 66, n. 2, p. 267-275, 2014.

CAPITULO 2

Investigação de gene de referência para análise em PCR quantitativa em tempo real em tecidos de cordonas de corte

Elaborada de acordo com as normas da Revista Pesquisa Agropecuária Brasileira
(<http://seer.sct.embrapa.br/index.php/pab>)

1 **INVESTIGAÇÃO DE GENE DE REFERÊNCIA PARA ANÁLISE EM PCR**
2 **QUANTITATIVA EM TEMPO REAL EM TECIDOS DE CORDONAS DE CORTE**

3
4 **Fabiana Cristina Belchior de Sousa ⁽¹⁾ e Katiene Régia Silva Sousa ⁽¹⁾**

5
6 (1) Universidade Federal do Piauí – UFPI, Campus Prof^a Cinobelina Elvas, CEP 64900-000 Bom
7 Jesus, PI, Brasil. Email: fabiana.cristina1@hotmail.com, katiregia@gmail.com

8
9
10 Resumo - Objetivou-se analisar a estabilidade de expressão de dez genes de referência
11 (ACTA1, ACTB, B2M, GAPDH, HMBS, HPRT1, MRPS27, MRPS30, RPL5) utilizados em
12 estudos de expressão gênica por meio de RT-qPCR em diferentes tecidos de codornas de corte.
13 Para avaliar a estabilidade dos genes de referência foi utilizando ferramentas estatísticas
14 geNorm , NormFinder, BestKeeper e método comparativo Ct. Após a análise dos níveis de
15 expressão pelos programas geNorm, NormFinder, BestKeeper e Método Comparativo de ΔCt
16 gerados pela ferramenta online RefFinder, observou-se que o HPRT1 foi o mais estável em
17 todos os tecidos analisados, seguido por MRPS30 no peito, B2M na gordura abdominal,
18 HMBS no fígado e RPL5 no intestino. Houve efeito do sexo na estabilidade dos genes
19 testados, sendo que os genes mais estáveis para os animais machos foram: HPRT1, MRPS30,
20 SDHA e, para fêmeas, os genes RPL5, HPRT1, MRPS30. Estes resultados podem ajudar em
21 ensaios de RT-qPCR que avaliem estes tecidos de codornas machos ou fêmeas, uma vez que
22 fornece dados sobre quais genes são mais estáveis e podem ser testados como candidatos a
23 genes de referência nas demais condições experimentais.

24
25 **Termos para indexação:** codorna europeia, estabilidade de expressão, gene endógeno

26 **Investigation in reference genes for analysis quantitative PCR real time tissues**
27 **quail in cutting**

28
29 Abstract – This study aimed to analyze the stability of ten reference gene expression (ACTA1,
30 ACTB, B2M, GAPDH, HMBS, HPRT1, MRPS27, MRPS30, RPL5) used in studies of gene
31 expression by RT-qPCR in different quails tissue court.To evaluate the stability of reference
32 genes was using statistical tools geNorm, NormFinder, BestKeeper and comparative Ct
33 method.After analyzing the expression levels in the programs, geNorm, NormFinder,
34 BestKeeper and Δ Ct Comparative Method generated by the tool online RefFinder , noted that
35 the HPRT1 was the most stable in all tissues analyzed, followed by MRPS30 pectoralis major,
36 B2M in abdominal fat, HMBS in liver and intestine RPL5. Was no effect of sex on the stability
37 of the genes tested, and the most stable genes for male animals were HPRT1, MRPS30, SDHA
38 and, for females the genes RPL5, HPRT1, MRPS30 were the most stable, in that order. These
39 results can help in assessing RT-qPCR these female or male quail tests, since it provides
40 information about which genes are more stable and can be tested as candidate reference genes
41 in other experimental conditions.

42
43 **Index terms:** quail european, expression stability, gene endogenous,
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56

Introdução

57

58 A reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (qPCR) é um método
59 eficiente e confiável para medir os níveis de expressão dos genes. Apresenta como
60 vantagem a sensibilidade, a detecção em tempo real do progresso da reação, a velocidade
61 de análise e medição precisa do material da amostra (GACHON et al., 2004). Como em
62 qualquer estudo de quantificação, é necessário corrigir variações das amostras, afim de
63 obter resultados fiáveis. O método mais utilizado é a normalização para a expressão de
64 um gene de controle interno, também chamado de gene de referência (OLIAS et al.,
65 2014).

66 O gene de referência ideal é expresso em níveis estáveis, independente do tipo de
67 tecido, espécie, sexo, tratamento e condições experimentais, entretanto esse gene ainda
68 não foi encontrado, provavelmente não exista, portanto torna-se claro que os genes de
69 referência precisam ser estabelecidos para cada nova condição experimental para
70 controlar as variações que possa vir influenciar os resultados (VANDESOMPELE et
71 al., 2002). Os GR mais utilizados são 18S (RNA ribossomal), ACTB (Beta actina) e
72 GAPDH (gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase) (KHURSHID et al., 2009; NERREN et
73 al., 2010). Entretanto estudos tem mostrado que a utilização desses genes de referência
74 individual para normalização pode influenciar os resultados do RNAm e o número de
75 quantificação (BUSTIN, 2000; DHEDA et al., 2005; RODONIC et al., 2004). Por isso a
76 estabilidade da expressão gênica necessita ser avaliada antes de usar os genes de interesse.
77 Esta estabilidade pode ser medida por meio de ferramentas e, dentre as mais utilizadas
78 estão o geNorm (VANDESOMPELE et al., 2002), NormFinder (ANDERSEN et al.,
79 2004). BestKeeper (PFAFFL et al., 2004) e o método comparativo Δ Ct (SILVER, 2006).

80 A codorna europeia (*Coturnix coturnix coturnix*) vem se destacando como
81 promissora para exploração doméstica, sendo atrativa, principalmente devido ao seu lado
82 econômico pois apresenta pequeno consumo de ração rápido crescimento e elevada

83 prolificidade, tornando-se um bom potencial de exploração zootécnica (CHAVES, 2013).
84 Vários estudos tem avaliado a adequabilidade de RGs na normalização de gene alvo em
85 diversas espécies de animais de produção tais como bovinos (LISOWSKI et al., 2008),
86 suínos (MARTÍNEZ-GINER et al., 2013), ovinos (ZANG et al., 2011), cabra
87 (NAJAFPANAH et al., 2013), cavalos (AHN et al., 2011) , frangos (NASCIMENTO et al.,
88 2015), e peixes (YANG et al., 2013). Embora recentes trabalhos de expressão genica com
89 uso de técnica de RT-qPCR tem sido relatados em codornas (DEL VESCO et al., 2016)
90 esses autores não avaliaram previamente a estabilidade e a adequabilidade do GR sob a
91 condição experimental testada.

92 Para nosso conhecimento, não há estudos semelhantes avaliando a estabilidade de
93 genes de referência adequados à normalização de dados de RT-qPCR em codornas de
94 cortes. Portanto, um melhor entendimento do perfil de expressão de genes de referência
95 normalizadores da expressão gênica em estudos de RT-qPCR torna-se necessário.
96 Objetivou-se determinar o perfil de transcritos expressos de genes de referência para
97 estudos de expressão genica por RT-qPCR em tecidos sólidos de codornas de corte.

98
99
100
101
102
103
104
105
106
107
108
109
110
111
112
113
114
115
116
117
118

Material e Método

119
120 O experimento foi aprovado pelo comitê de ética da Universidade Federal de
121 Sergipe. Foram coletados amostras de quatro tecidos (músculo do peito, gordura
122 abdominal, fígado e intestino) de seis codornas de corte de corte (*Coturnix coturnix*
123 *coturnix*) de 35 dias de idade sendo três machos (n=3) e três fêmeas (n=3). As aves foram
124 obtidas de uma granja de produção comercial da cidade de São Cristovão - SE. Todas as
125 amostras foram isoladas e armazenadas em tubos esterilizados contendo RNAlater
126 (Ambion, RNA Carlsbad, CA, USA). As amostras foram estocadas a 4°C por 12h e depois
127 a -20°C até o momento da extração do RNA total.

128 O RNA total foi extraído utilizando o reagente Trizol (Invitrogen, Gaithersburg,
129 MD) de acordo com as instruções do fabricante. A concentração de RNA foi determinada
130 por meio do espectrofotômetro AstraGene UV/Vis (AstraNet Inc., Bath, UK) utilizando
131 2,5ul do RNA extraído. A integridade do RNA foi avaliada por meio de gel de agarose 1%,
132 a 100V por 30 min. Após essa verificação, 1ug de RNA total de cada grupo foi submetido
133 à transcrição reversa utilizando o kit GoScript *Reverse Transcription System* (Promega,
134 Madison, WI, EUA) seguindo instruções do fabricante. As amostras de cDNA resultantes
135 foram armazenadas a -20°C até a análise de RT-qPCR ser realizada.

136 Dez genes de referência foram escolhidos com base na literatura, ditos como de
137 expressão estável, e as sequências nucleotídicas foram obtidas do banco de dados *Ensembl*
138 (www.ensembl.org). Os desenhos dos *primers* foram realizados a partir do software
139 *PrimerQuest* fornecido pela empresa *DNA Technologies, Inc* (IDT, Coralville, IA, USA) a
140 análise em *BLAST* foi executada verificar a especificidade da sequência. Os conjuntos de
141 *primers* que foram utilizados podem ser visualizados no Quadro 1.

142 **Quadro 1.** Sequências de nucleotídeos, tamanho do amplicon e temperatura de anelamento dos *primers* utilizados para as reações de RT-
 143 qPCR em Tempo Real.

Gene símbolo	Transcrito ID	Descrição	Sequência de primer (5'-3')	Ta (°C)	Amplicon (bp)
ACTA1	ENSGALE00000120039	Alfa-actina 1	F: CTCCGGCGATGGTGTGA R: CAGTCAGGATCTTCATCAGGTAGT	62	122
ACTB	ENSGALT00000015673	Beta- actina	F: ACCCCAAAGCCAACAGA R: CCAGAGTCCATCACAATACC	60	136
B2M	Z48922	Beta-2-microglobulina	F: CCACCCAAGATCTCCATCAC R: CGTCCAGTCGTCGTTGAA	62	90
GAPDH	ENSGALE00000024703	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase	F: CTGTAGCCCATATCTTGCCTTT R: CAAGACGATCTCCACTCTTTCC	60	95
HMBS	ENSGALE00000001922	Hidroximetilbilano Sintase	F: TGACCTGGTAGTTCCTCCTT R: TTGCAAATAGCACCAATGGTAAAG	60	75
HPRT1	AJ132697	Hipoxantina Fosforribosiltransferase 1	F: GCACTATGACTCTACCGACTATTG R: CAGTTCTGGGTTGATGAGGTT	60	112
SDHA	ENSGALE00000067556	Complexo desidrogenase de succinato subunida	F: CTATGTGGCCTGGAAGATCAG R: GCAGCTCAGAGGATGGATG	60	124
MRPS27	XM_424803	Proteína ribossomal S27	F: GCTCCCAGCTCTATGGTTATG R: ATCACCTGCAAGGCTCTATTT	60	124
MRPS30	NM_204939.1	Proteína ribossomal S30	F: CCTGAATCCCGAGGTTAACTATT R: GAGGTGCGGCTTATCATCTATC	60	107
RPL5	NM_204157.2	Proteína ribossomal L5	F: GCCCGAAGTTCCTGAAATCT R: AACGACCCAGAGGAGGATAA	60	102

144 Bp Pares de bases*, Ta Temperatura de anelamento*

145 Antes da amplificação, parte do cDNA foi colocado em um novo tubo para fazer
146 uma amostra composta (*pool*), contendo uma amostragem geral dos diferentes perfis de
147 RNA estudados. Esse *pool* foi então diluído para construir curvas padrão para otimização e
148 os cálculos de eficiência na PCR. Assim, quatro concentrações de cDNA (1, 5, 15 e 45 ng)
149 e quatro concentrações de primers (200, 400, 800 e 1000 nM) foram testadas. As condições
150 experimentais da RT-qPCR foram as seguintes: um ciclo de 95°C por 10 minutos, 40 ciclos
151 a 95°C por 10 segundos e 60 segundos a 60-62°C. Um passo adicional com aumento
152 gradual de temperatura foi acrescentado, aumentando de 60-62°C para 95°C, para a
153 obtenção da curva de dissociação. Um *mix* de reação sem *template* foi também utilizado
154 para detectar possíveis contaminações por reagentes. A reação de amplificação da PCR foi
155 realizada em diferentes poços cada par de *primer* tendo sua especificidade conferida por
156 meio do tamanho do *amplicon*, em eletroforese em gel de agarose a 1,5%. A eficiência de
157 amplificação foi calculada para cada gene de referência usando a fórmula $E = (10^{(-1/\text{slope})} -$
158 $1) \times 100$ (PFAFFL, 2001). Após a análise de eficiência, a temperatura de anelamento e
159 concentração de *primer* mais adequadas foram empregadas nas reações de PCR

160 Todas as reações foram realizadas em termociclador CFX96 Real-Time PCR
161 *Detection System*, usando como método de detecção *SYBR green* com *GoTaq qPCR*
162 *Master Mix* (Promega, Madison, WI, USA), e os *primers* aplicados eram específicos para
163 cada gene. As condições térmicas dos ciclos para a RT-qPCR foram as seguintes: 1 ciclo a
164 95°C durante 10 min, 40 ciclos de amplificação a 95°C durante 15 segundos e anelamento
165 a 60-62°C durante 1 minuto. A média do ciclo de quantificação (Ct) foi determinada
166 utilizando o manual de configurações de quantificação. Valores de Ct para os poços
167 controle foram excluídos de análises posteriores, assim como os valores que se
168 apresentaram superiores a 35 ou não detectados.

169 A estabilidade de expressão dos genes de referência foi determinada por meio de
170 quatro métodos: BestKeeper (PFAFFL et al., 2004), geNorm (VANDESOMPELE et al.,
171 2002), NormFinder (ANDERSEN et al., 2004) e método comparativo de Δ Ct (SILVER et
172 al., 2006), através do programa RefFinder (<http://fulxie.0fees.us/?type=reference>), que
173 integra os quatro algoritmos para comparar e classificar a estabilidade dos genes. Para o
174 geNorm e NormFinder, os valores usados para o cálculo são os da expressão relativa
175 estimados a partir dos valores de Ct, já para o BestKeeper e o método comparativo de Δ Ct
176 os valores utilizados para fins de cálculo da estabilidade, são os próprios valores de Ct
177 inseridos no RefFinder.

178 O RefFinder é uma ferramenta que analisa separadamente cada algoritmo utilizado
179 e fornece uma classificação geral do melhor normalizador para a condição experimental
180 testada, obtida através da combinação dos resultados dos quatro algoritmos.

181

182 **Resultados e Discussão**

183 **Perfil de expressão dos genes de referência**

184 A avaliação dos valores de Ct foi feita pela estatística descritiva fornecida pelo
185 BestKeeper, separadamente para cada tecido (músculo do peito, gordura abdominal, fígado
186 e intestino). Essa análise indicou variabilidade no perfil de expressão dos genes. Os dez
187 genes foram distribuídos em duas categorias diferentes dos níveis de expressão. Três genes
188 ACTB, ACTA1, RPL5, obtiveram alta expressão de RNAm com a maioria dos valores de
189 Ct entre 19 a 20, os demais genes foram moderadamente expresso com valores de Ct entre
190 21 e 31 ciclos entre todos os tecidos avaliados. (Tabela 1).

191 A partir dos dados apresentados na Tabela 1, referente aos valores de desvio padrão
192 (SD) e coeficiente de variação (CV%), observou-se que, dentre os genes testados na
193 musculatura do peito, RPL5 é o que apresenta o menor valor de SD (0,56) e B2M/SDHA
194 apresentam os menores valores de CV% (2,55). Para a gordura abdominal o MRPS27 é o

195 que apresenta menor SD (0,43) e CV% (1,89). No fígado o menor valor de desvio padrão
 196 foi observado para MRPS27 (0,39), seguindo do SDHA com CV% (1,67). O menor valor
 197 de desvio padrão e coeficiente de variação para o tecido do intestino é HPRT1 (0,25 e
 198 1,17) respectivamente, indicando estabilidade de expressão deste gene.

199 **Tabela 1.** Dados estatísticos gerados pelo programa BestKeeper para os dez genes de
 200 referência avaliados nos tecidos (músculo do peito, gordura abdominal, fígado, intestino).

Músculo do Peito										
FATOR	ACTB	HPRT1	ACTA1	GAPDH	HMBS	SDHA	B2M	MRP27	MRP30	RPL5
Med geo[Cq]	19,94	22,20	20,25	21,72	28,40	25,73	30,12	22,75	26,53	20,81
Med ar [Cq]	20,08	22,22	20,28	21,83	28,44	25,74	30,14	22,77	26,56	20,82
Min [Cq]	17,97	21,15	18,90	19,35	27,10	24,78	28,34	21,45	25,15	19,50
Max [Cq]	25,09	23,95	22,30	26,43	31,87	27,16	30,97	24,82	28,70	22,02
SD [± Cq]	2,02	0,73	0,99	1,58	1,15	0,66	0,77	0,83	0,89	0,56
CV [%]	10,07	3,30	4,88	7,24	4,04	2,55	2,55	3,64	3,36	2,70
Coeff.corr.[r]	0,98	0,91	0,75	0,95	0,96	-0,40	0,49	0,91	0,97	0,60
Gordura Abdominal										
Medgeo[Cq]	19,31	21,87	20,38	21,69	28,15	26,42	30,33	22,72	26,41	20,79
Med ar [Cq]	19,37	21,89	20,43	21,74	28,18	26,44	30,35	22,73	26,44	20,80
Min [Cq]	16,79	20,27	18,53	19,16	26,20	24,98	28,34	22,03	24,98	19,93
Max [Cq]	21,92	23,41	23,01	24,56	30,17	27,73	32,56	24,03	28,38	22,14
SD [± Cq]	1,19	0,64	1,24	1,10	1,06	0,90	0,75	0,43	1,07	0,45
CV [%]	6,15	2,93	6,05	5,06	3,77	3,39	2,49	1,89	4,06	2,15
Coeff.corr.[r]	0,86	0,95	0,95	0,94	0,84	0,36	0,88	0,20	0,89	0,87
Fígado										
Med geo[Cq]	19,66	21,63	20,58	22,84	27,38	25,36	29,98	21,81	26,45	20,70
Med ar [Cq]	19,86	21,65	20,64	23,05	27,43	25,37	30,01	21,81	26,46	20,71
Min [Cq]	17,22	20,42	19,46	20,03	26,30	24,34	28,25	21,17	25,74	19,97
Max [Cq]	26,29	24,04	24,43	30,16	31,48	26,27	32,85	22,63	28,01	21,61
SD [± Cq]	2,30	0,8	1,21	2,46	1,19	0,42	0,89	0,39	0,59	0,47
CV [%]	11,58	3,70	5,84	10,69	4,33	1,67	2,98	1,77	2,24	2,28
Coeff.corr.[r]	0,99	0,97	0,96	0,99	0,97	-0,81	0,92	0,87	0,98	0,61
Intestino										
Med geo[Cq]	18,53	21,11	20,21	20,71	27,00	25,57	29,19	22,43	26,02	20,18
Med ar [Cq]	18,54	21,11	20,21	20,73	27,00	25,57	29,20	22,44	26,03	20,18
Min [Cq]	17,29	20,45	19,56	19,38	26,33	24,76	27,91	21,31	25,20	19,13
Max [Cq]	19,35	21,63	20,57	22,13	27,97	26,01	30,53	23,70	26,63	20,94
SD [± Cq]	0,45	0,25	0,28	0,95	0,40	0,31	0,62	0,56	0,34	0,40
CV [%]	2,45	1,17	1,38	4,58	1,46	1,21	2,13	2,51	1,30	1,98
Coeff.corr.[r]	0,31	0,80	0,53	0,95	0,85	0,66	0,77	0,18	0,77	0,86

201 Cq: ciclo de quantificação; Med geo: média geométrica de Cq; Med ar: média aritmética de Cq; min e
 202 max Cq: valor mínimo e máximo de Cq; SD: desvio padrão; CV: coeficiente de variação; r: coeficiente
 203 de correlação.

204

205 **Efeito do tipo de tecido na estabilidade dos genes de referência**

206 Para avaliar a estabilidade de expressão dos genes candidatos a normalizadores,
207 além da análise do desvio padrão e coeficiente de variância também foi calculada e
208 comparada a estabilidade média de expressão (M) utilizando os algoritmos dos programas,
209 geNorm, NormFinder, BestKeeper e o método comparativo de Ct.

210 De acordo com o algoritmo do programa geNorm com base nos valores de M
211 (Tabela 2) calculados para o tecido do músculo do peito, observou-se que os genes
212 HPRT1/MRPS27 (M= 0,23) são os mais estáveis, seguidos de ACTA1 (M= 0,49). Os
213 genes mais estáveis na gordura abdominal é HPRT1/B2M (M= 0,44) e RPL5 (M= 0,55).
214 No fígado os genes ACTA1/HMBS (M=0,43) e HPRT1 (M=0,60) foram os genes que
215 apresentaram maior estabilidade. Para amostra do tecido do intestino os genes mais
216 estáveis foram HPRT1/RPL5 (M=0,25) e HMBS (0,29).

217 Para o programa NormFinder (Tabela 2), os genes candidatos que possui menor
218 valor de M para o músculo do peito é MRPS30 (M= 0,31), HPRT1(M=0,35) e
219 MRPS27(M=0,39). Na gordura abdominal o gene que apresentou menor valor de M foi
220 HPRT1, com M=0,18, seguindo de M=0,51 e 0,56 para RPL5 e MRPS30, respectivamente.
221 Para o fígado o HPRT1 (M=0,25), B2M (M=0,33) e HMBS (M=0,37) foram os que
222 apresentaram menor valor de M. Os genes com menor valor de M para o intestino foi
223 HPRT1 M=0,18, seguindo por RPL5 (M=0,25) e HMBS (M=0,29). Estes dados são
224 semelhantes aos encontrados na análise pelo geNorm, pelo fato de que todas estas análises
225 levaram em consideração os valores de expressão relativa calculados a partir dos valores
226 de Ct.

227 O Bestkeeper com base nos valores de r calculados para os dez genes, mostrado na
228 tabela 2, observou-se que ACTB (r=0,98) foi o gene mais estável no músculo do peito,
229 seguindo pelo HPRT1/ACTA1 (r=0,95) na gordura abdominal. O gene GAPDH foi o mais

230 estável para o fígado e intestino ($r=0,99$ e $0,95$, respectivamente). Os valores mais baixos
231 foram observados para os genes SDHA ($r= -0,40$) no músculo do peito e fígado, para a
232 gordura e intestino o gene menos estável foi MRPS27 ($r=0,20$ e $0,18$, respectivamente.)
233 (Tabela 2).

234 O método comparativo de Ct (Tabela 2), apresentou uma ordem de estabilidade de
235 expressão igual ao algoritmo NormFinder para o tecido do músculo do peito, para os três
236 primeiros genes, MRPS30 ($M=1,02$), HPRT1 ($M=1,03$), MRPS27 ($M=1,06$), porém
237 apresentou valores de M diferentes para gordura, variando de $M=0,94$ (B2M) a $M=10,4$
238 (HMBS). Houve diferença também para o tecido do fígado $M=1,19$ (MRPS30) a $M=2,14$
239 (ACTB), para o intestino os valores variaram para os genes RPL5 ($M=0,54$) e MRPS27
240 ($M=0,90$).

241

242

243

244

245

246

247

248

249

250

251

252

253

254

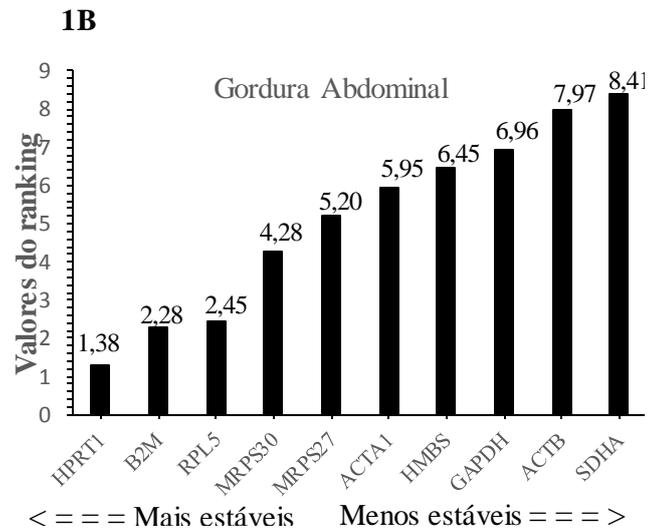
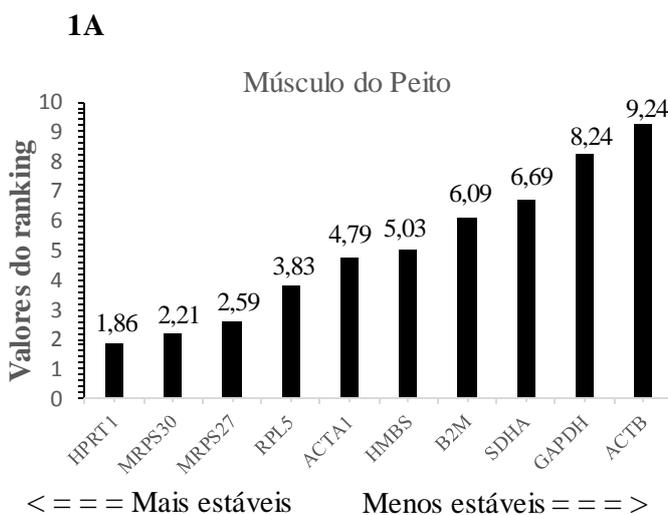
255 **Tabela 2.** Valores de estabilidade para os genes de referência classificado pelo algoritmo,
 256 geNorm, NormFinder, BestKeeper e método comparativo Δ Ct para músculo do peito, gordura
 257 abdominal, fígado e intestino em codornas.

Tecidos	Genes	<u>geNorm</u>		<u>NormFinder</u>		<u>Bestkeeper</u>		<u>Método ΔCt</u>	
		Estabilidade	Rank	Estabilidade	Rank	Estabilidade	Rank	Estabilidade	Rank
Peito	ACTA1	0,49	2	0,81	5	0,75	6	1,25	5
	ACTB	1,23	7	1,67	9	0,98	1	1,83	9
	B2M	0,93	5	1,05	7	0,49	8	1,43	7
	GAPDH	1,11	6	1,45	8	0,95	4	1,68	8
	HPRT1	0,23	1	0,35	2	0,91	5	1,03	2
	HMBS	0,71	4	0,54	4	0,96	3	1,17	4
	MRPS27	0,23	1	0,39	3	0,91	5	1,06	3
	MRPS30	0,61	3	0,31	1	0,97	2	1,02	1
	RPL5	0,93	5	0,90	6	0,60	7	1,30	6
	SDHA	1,36	8	1,70	10	-0,40	10	1,87	10
Gordura	ACTA1	0,75	4	0,67	5	0,95	1	1,01	5
	ACTB	0,84	6	1,02	7	0,86	6	1,20	7
	B2M	0,44	1	0,57	4	0,80	8	0,94	2
	GAPDH	0,79	5	0,86	6	0,94	2	1,08	6
	HPRT1	0,44	1	0,18	1	0,95	1	0,82	1
	HMBS	0,89	7	0,67	5	0,84	7	10,4	10
	MRPS27	0,98	8	1,07	8	0,20	10	1,28	8
	MRPS30	0,70	3	0,56	3	0,89	3	0,96	4
	RPL5	0,55	2	0,51	2	0,80	4	0,95	3
	SDHA	1,06	9	1,21	9	0,36	9	1,37	9
Fígado	ACTA1	0,43	1	0,38	4	0,97	3	1,27	6
	ACTB	1,33	7	1,9	8	0,98	2	2,14	5
	B2M	0,67	3	0,33	2	0,92	4	1,23	3
	GAPDH	1,54	8	2,33	10	0,99	1	2,41	10
	HPRT1	0,60	2	0,25	1	0,97	3	1,13	1
	HMBS	0,43	1	0,37	3	0,97	3	1,26	4
	MRPS27	0,86	5	0,94	6	0,87	5	1,34	7
	MRPS30	0,73	4	0,50	5	0,98	2	1,19	2
	RPL5	0,86	5	1,11	7	0,60	6	1,44	8
	SDHA	1,04	6	1,95	9	-0,40	7	2,05	9
Intestino	ACTA1	0,33	3	0,36	5	0,53	8	0,59	4
	ACTB	0,54	6	0,68	9	0,31	9	0,82	6
	B2M	0,47	5	0,47	7	0,76	6	0,77	5
	GAPDH	0,60	7	0,75	10	0,95	1	0,87	7
	HPRT1	0,25	1	0,18	1	0,80	4	0,52	1
	HMBS	0,29	2	0,29	3	0,85	3	0,54	2
	MRPS27	0,66	8	0,66	8	0,18	10	0,90	8
	MRPS30	0,33	3	0,33	4	0,77	5	0,54	2
	RPL5	0,25	1	0,25	2	0,86	2	0,54	2
	SDHA	0,38	4	0,38	6	0,66	7	0,58	3

259 No geral, a classificação obtida com o geNorm, NormFinder e o método do ΔC_t foram
 260 parecidos em apontar a maioria dos genes mais estáveis, diferente da classificação do
 261 BestKeeper. Isto é devido por que, o geNorm assim como o NormFinder e o método do
 262 ΔC_t usam diferentes medidas de variação dos valores de C_t , enquanto a análise pelo
 263 Bestkeeper é baseada na correlação dos valores de C_t entre os genes.

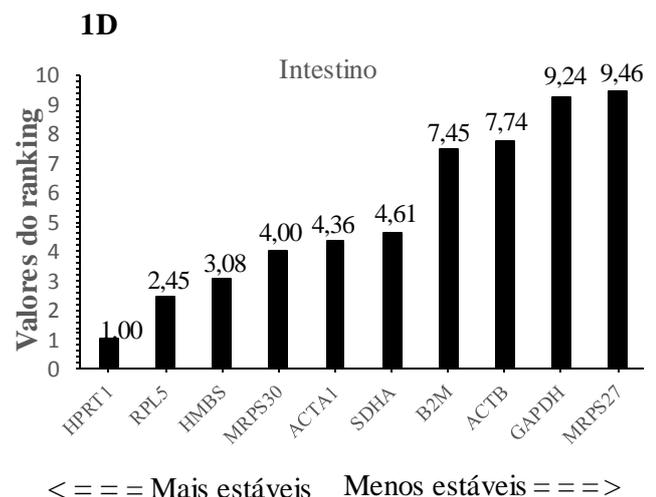
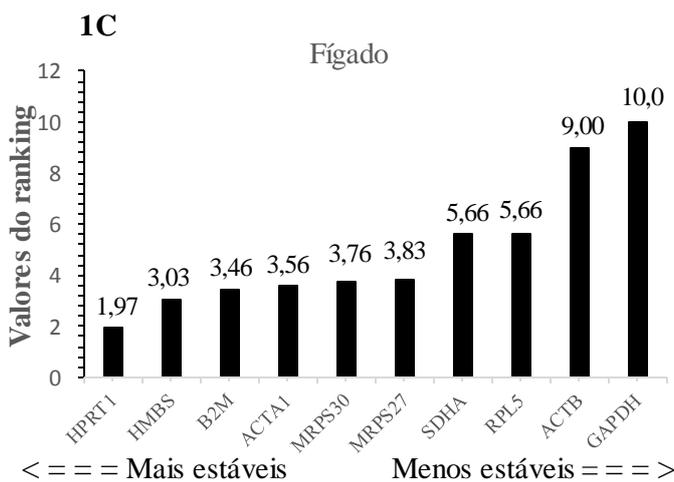
264 O gene mais estável para todos os tecidos analisados de acordo com a classificação
 265 geral do RefFinder foi o HPRT1. Os candidatos a genes de referência mais estável no
 266 tecido do músculo do peito foram: HPRT1, MRPS30, MRPS27 (Figura 1A). Para a
 267 gordura: HPRT1, B2M, RPL5, (Figura 1B). No fígado, a classificação geral foi HPRT1,
 268 HMBS, B2M (Figura 1C). No tecido do intestino foi: HPRT1, RPL5, HMBS, Figura (1D).

269
 270



271

272

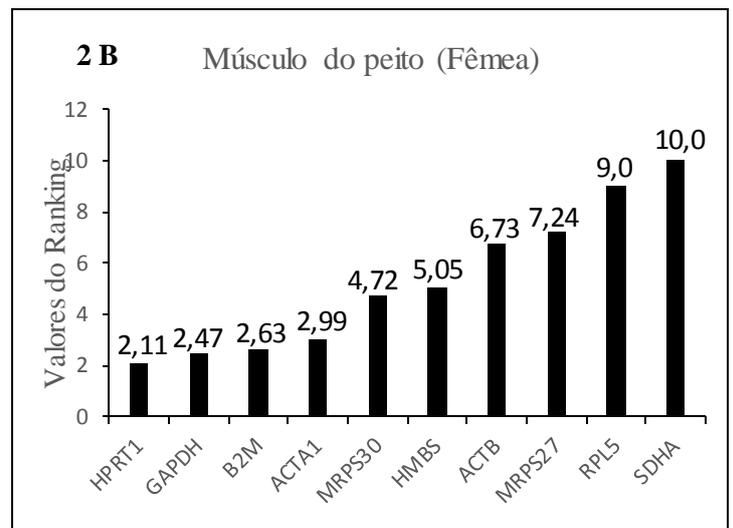
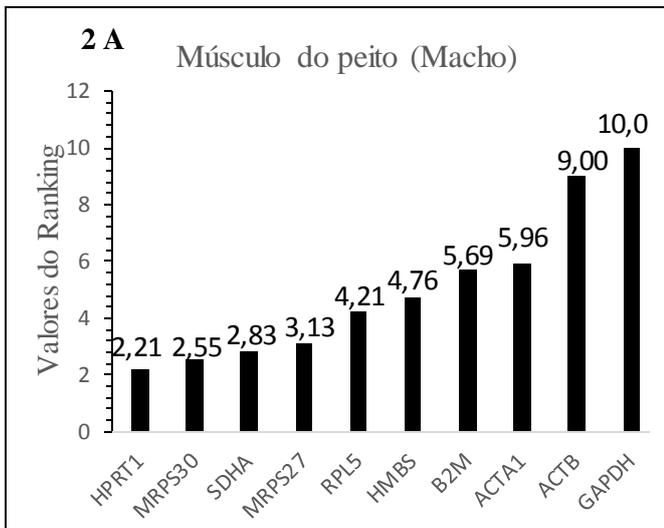


273 **Figura 1.** Estabilidade da média de expressão de acordo com os valores de estabilidade do
 274 RefFinder, de dez genes candidatos a normalizadores, para músculo do peito (Fig. 1A), gordura
 275 abdominal (Fig. 1B), fígado (Fig. 1C) e intestino (Fig. 1D) em codornas. Valores mais baixos
 276 indicam expressão mais estável.

277 **Efeito de sexo na estabilidade dos genes de referência**

278 Além da análise separada para cada algoritmo utilizado e uma classificação geral do
 279 melhor normalizador para cada tecido, foram observadas também diferenças na
 280 estabilidade dos genes testados entre machos e fêmeas obtida através do RefFinder.
 281 Observa-se na Figura 2, que não houve diferença de expressão do HPRT1 na musculatura
 282 do peito entre os sexos. Para os demais tecidos (gordura abdominal, fígado e intestino)
 283 houve diferença entre machos e fêmeas para os genes HPRT1, MRPS30 e SDHA, RPL5,
 284 HPRT1, MRPS30, respectivamente.

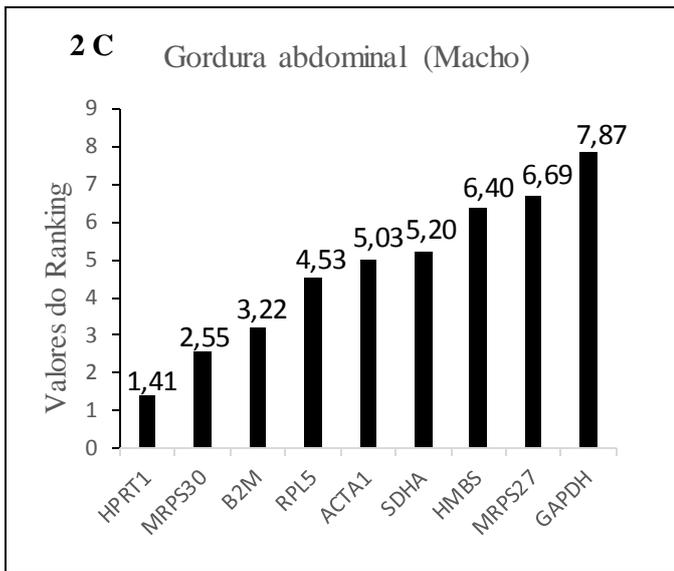
285



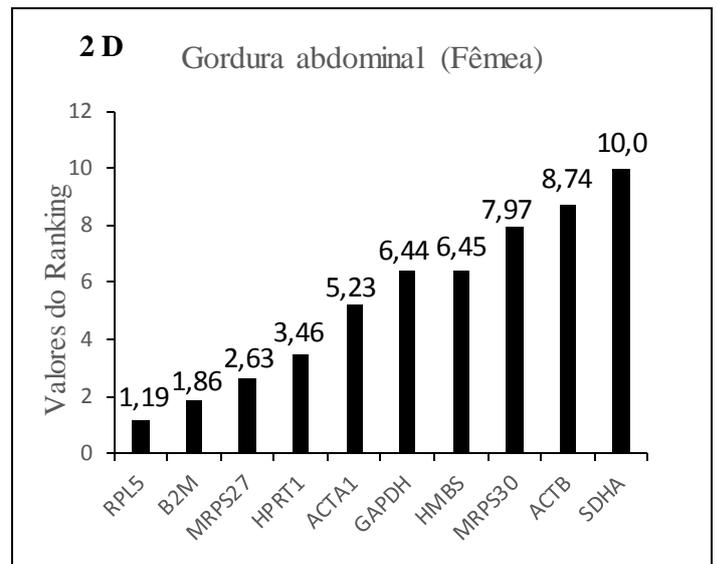
286 < == = Mais estáveis Menos estáveis == = >

< == = Mais estáveis Menos estáveis == = >

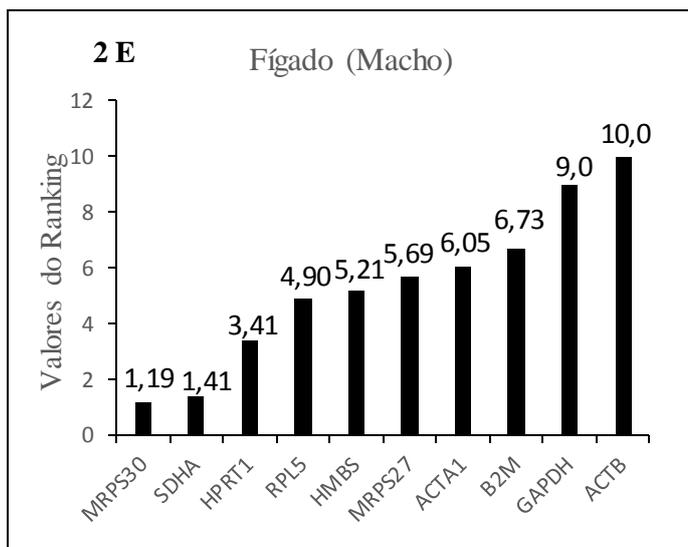
287



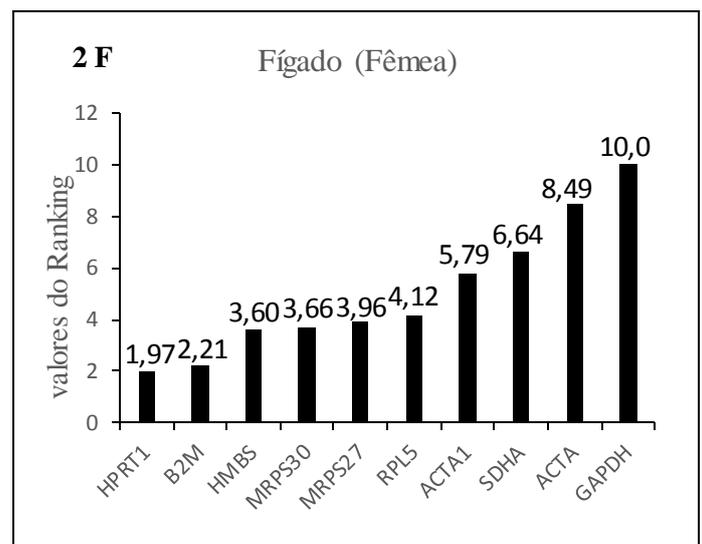
289 > == Mais estáveis Menos estáveis == >
290



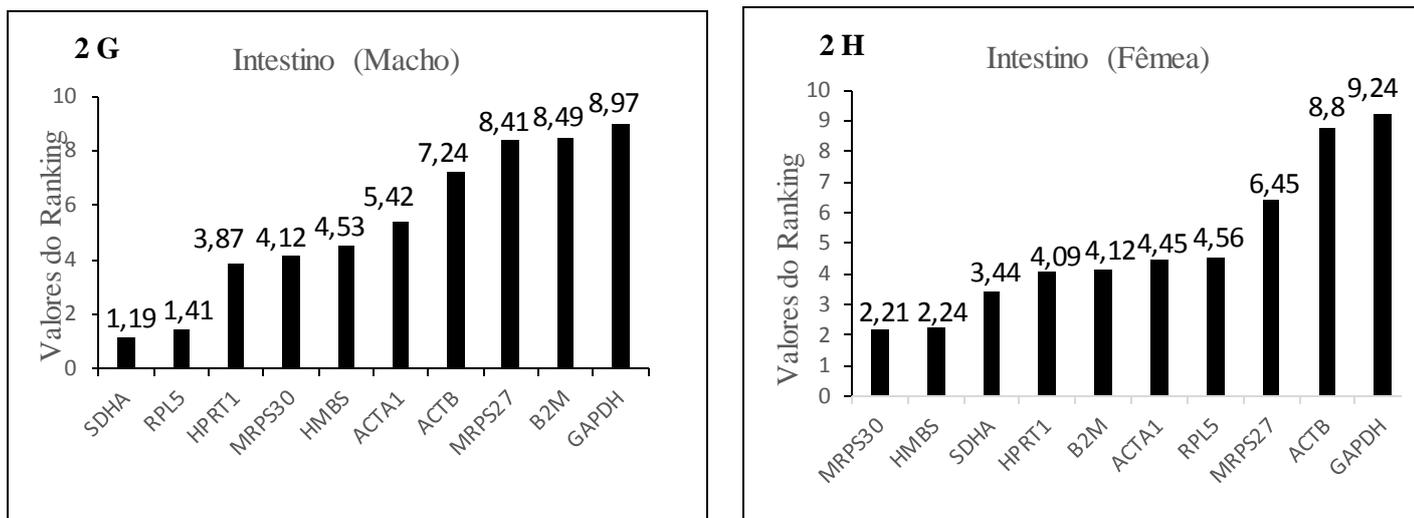
< == Mais estáveis Menos estáveis == >



291 < == Mais estáveis Menos estáveis == >
292



< == Mais estáveis Menos estáveis == >



294 < == = Mais estáveis Menos estáveis == = >

< == = Mais estáveis Menos estáveis == = >

295

296 **Figura 2.** Classificação geral dos genes para o músculo do peito (Fig. 2 A Macho, 2 B Fêmea),
 297 gordura abdominal (Fig. 2 C Macho, 2 D Fêmea), fígado (Fig. 2 E Macho, 2 F Fêmea) e intestino
 298 (Fig. 2 G Macho, 2 H Fêmea) de codornas.

299

300 O gene HPRT1 foi o mais estável em todos os tecidos apresentando características
 301 constitutivas, uma vez que é uma transferase que catalisa a conversão de inosina-
 302 monofosfato de hipoxantina e guanina monofosfato de guanina. Está envolvida na
 303 transferência de grupo fosfato para as purinas tem um papel central na geração de
 304 nucleotídeos e desempenha uma importante função na recuperação de purinas de DNA
 305 degradado para reintroduzir em vias de síntese de purinas (SCULLEY et al., 1992).O que
 306 justifica sua expressão de forma estável em todos os tecidos, já que faz parte de uma rota
 307 essencial para as células.

308 Os resultados apresentados estão em concordância com PIERZCHALA et al.
 309 (2011), ao analisar a expressão de cinco genes de referência em suínos desafiados com
 310 lipopolissacarídeos, observaram que o gene mais estável no fígado, gordura abdominal e
 311 musculatura esquelética foi HPRT1 e TBP, respectivamente. NASCIMENTO et al. (2015),
 312 no estudo realizado em músculo do peito de galinha, observaram que os genes de

313 referência mais estáveis foram HPRT1, HMBS, ACTA1. ZINZOW-KRAMER et al (2013)
314 avaliando a expressão de dez genes de referência em duas espécies de aves canora
315 (tentilhão e pardal branco) em diferentes tecidos observaram que os genes mais estáveis
316 foram HPRT, RPL4 e PPIA. Diferindo dos resultados CHAPMAN et al (2016) estudando
317 gene de referência em tecidos de patos selvagem observaram que o HPRT apresentou os
318 menores níveis de expressão em todos os tecidos exceto no sangue. Enquanto que o ACTB
319 apresentou os maiores níveis de expressão em todos os tecidos exceto no pulmão.

320 VEAZEY e GOLDING (2011) procurando identificar genes de referência mais
321 estáveis e adequados para estudos de expressão genética em três linhagem de células-
322 tronco embrionária de mamíferos dos quatorzes genes de referência utilizados
323 identificaram o PGK1, SDHA e TBP como os genes de referência mais estáveis. Diferindo
324 dos nossos resultados onde o gene SDHA apresentou como menos estável em todos os
325 tecidos analisados. Corroborando com nossos resultados VEAZEY e GOLDING (2011)
326 classificaram os genes de referência ACTB e GAPDH como menos estáveis mostrando
327 evidências para sugerir que estes genes não são controles de normalização adequados para
328 estes estudos.

329 O MRPS30 mostrou-se o segundo gene mais estável no músculo peito de codornas.
330 Este gene é uma proteína ribossomal mitocondrial codificada por genes nucleares, a síntese
331 de proteínas dentro da mitocôndria é auxiliada por eles. Além disso, este ribossomo do
332 qual o gene em questão faz parte, consistem em 75% das proteínas para composição de
333 RNA ribossômico e, sendo assim, estão em abundância nas células e sua expressão é
334 considerada contínua (<http://genecards.org>). Por essa razão, tal gene se mostrou estável
335 neste estudo, por ser requerido continuamente nas células fazendo parte de processos
336 indispensáveis à manutenção das mesmas.

337 Na amostra de gordura abdominal, o segundo gene que apresentou maior
338 estabilidade foi o B2M, que codifica uma proteína do complexo de histocompatibilidade
339 (MHC) responsável pelo fator de alongação alfa-1, responsável pela entrega enzimática da
340 aminoacil-RNAt sintetase para o ribossomo durante a síntese de proteínas
341 (<http://genecards.org>). BANGÉS et al (2015) em um estudo para normalização de genes de
342 referência para tecidos de suínos, concluíram que o gene mais estável foi B2M quando
343 analisado na gordura abdominal. Diferindo dos nossos resultados CHECHI et al., (2012)
344 estudando a validação de genes de referência em tecido adiposo de humanos identificaram
345 como os genes mais estáveis o CYCA , GAPDH e RPL27.

346 O segundo GR mais estável no fígado foi HMBS, este gene faz parte da enzima
347 conhecida como hidroximetilbilano sintase, que está envolvida na produção de moléculas
348 chamada de heme, a qual está presente em todos os órgãos do corpo, embora seja mais
349 abundante no fígado, sangue e medula óssea (BADMINTON et al.,2005). Dessa forma o
350 gene HMBS está envolvido no processo metabólico de sobrevivência da célula, e atua de
351 forma frequente, o que explica em parte sua maior expressão nesse tecido. YIN et al (2011)
352 analisando a estabilidade de genes de referência em fibroblastos de embriões de galinhas
353 infectado com vírus de Newcastle, observou que os genes HMBS, HPRT1 e ACTB foram
354 os que apresentaram mais estáveis.

355 O gene RPL5 codifica para uma proteína que participa da composição da organela
356 ribossomo pertence à família de proteínas ribossomais L18P, está localizado no
357 citoplasma. A proteína atua especificamente com a subunidade beta de caseína-quinase II,
358 sendo típico para os genes que codificam proteínas ribossomais (<http://genecards.org>).
359 NYGARD et al., (2007) analisando a estabilidade de genes de referência em tecidos de
360 suínos observou que o RPL5 foi o segundo gene mais estável no tecido do intestino.

361 Com base nos resultados, pode-se afirmar que os genes mais estáveis encontrados
362 no tecido do músculo do peito, gordura abdominal, fígado e intestino de codornas de corte
363 macho foi o HPRT1, MRPS30 e SDHA. Os genes HPRT1, MRPS30 e SDHA apresentam
364 características constitutivas uma vez que estão envolvidos em processos como a ativação
365 da transcrição, iniciação da apoptose nas células e transporte axoplasmático (TARZE et al.,
366 2007).

367 De acordo com MADEIRA (2005), a maior área de fibra glicolítica está associada à
368 maior atividade física dos genes e ainda, GONZALES & SARTORI (2002) consideraram
369 que fatores hormonais são fundamentais no processo de síntese de proteína muscular.
370 Sendo a expressão do gene SDHA mais expresso nos tecidos de machos, e considerando
371 que esta expressão ocorre de forma constante. Os genes HPRT1, MRPS30 E SDHA podem
372 ser utilizados como candidato a gene de referência nos estudos que avaliam características
373 em codornas machos.

374 Nas fêmeas, os genes HPRT1, RPL5 e MRPS30 foram os mais estáveis. Estes
375 genes estão envolvidos em processos metabólicos de sobrevivência da célula, e atua de
376 forma frequente, o que explica em parte sua maior expressão e estabilidade no tecido.
377 Quanto à sua maior estabilidade nas aves fêmeas, isto pode ser devido às fibras presentes
378 nestes animais, que são de contração rápida e mais oxidativas que as fibras dos machos,
379 uma vez que uma oxidação moderada das proteínas aumenta sua susceptibilidade à
380 proteólise e as torna substrato para o proteossomo (GRUNE et al., 2003).

381 Trabalhos mostram essa diferença de expressão dos genes entre as espécies, sexo e
382 os tecidos analisados. MCCURLEY & CALLARD (2008) ao analisarem a expressão de
383 genes referência para o sexo e diferentes tecidos em peixe zebrafish observou diferença na
384 expressão do TBP e GAPDH no músculo esquelético e cardíaco, onde a maior expressão
385 foi observada na fêmea que nos machos. Diferenças também foram observadas em cinco

386 genes (ACTB, GAPDH, G6PD, TBP, B2M) quando comparada no ovário e testículos
387 (MCCURLEY& CALLARD 2008).

388 MO et al. (2014) constataram que sete genes comumente utilizados como genes de
389 referência (ACTB, B2M, EEF1, GAPDH, TUBA, RPL8), apresentaram variabilidade
390 significativa entre machos e fêmeas, quando testados no hepatopâncreas de peixes.
391 Enquanto ZINZOW-KRAMER et al. (2014) constataram que a normalização para os genes
392 GAPDH e PIA juntos, foi capaz de detectar diferença entre sexos para aves canoras. Assim
393 como na normalização para os genes GAPDH, RPL32, ACTB e 18S individualmente,
394 mostrou diferença significativa na expressão gênica entre machos e fêmeas.

395 Ao utilizar genes de referência que tem uma expressão estável entre diferentes
396 grupos e tecidos em comparação é essencial na análise de expressão genica, já que estes
397 podem alterar a interpretação dos dados analisados, entretanto, uma normalização eficiente
398 torna-se indispensável para a confiabilidade dos resultados, especialmente na verificação
399 da relevância biológica de pequenas diferenças ou no estudo de amostras de diferentes
400 tecidos ou órgãos (GUÉNIN, 2009).

401
402
403

Conclusão

404 O gene de referência mais estável para estudos de expressão gênica entre todos os
405 tecidos de codornas avaliados foi o HPRT1. Dentro de cada tecido, MRPS30 foi o mais
406 estável no músculo do peito, B2M na gordura abdominal, HMBS no fígado e RPL5 no
407 intestino.

408 A estabilidade dos genes de referência nos tecidos analisados foi influenciada pelo
409 sexo em codornas de corte independente do tecido avaliado sendo que para machos os
410 genes mais estáveis foram: HPRT1, MRPS30, SDHA; e, para fêmeas os mais estáveis
411 foram: RPL5, HPRT1, MRPS30.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

412
413

414 ANDERSEN, C. L.; JENSEN, J. L.; ORNTOFT, T. F. Normalization of real-time quantitative
415 reverse transcription-PCR data: A model-based variance estimation approach to identify
416 genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. **Cancer**
417 **Research**. v. 416 64, s/n. p. 5245–5250, 2004.

418

419 BADMINTON, M.N, ELDER, G.H. Molecular mechanisms of dominant expression in
420 porphyria. **Journal inherited metabolic disease**, v.28, n.3, p. 277-86, 2005.

421 BAGÉS, J.; ESTANY, J.; TOR, M.; PENA, R.N. Investigating reference gene for quantitative
422 real time PCR analysis four chicken tissues. **Gene**. v. 561, p.82-87, 2015.

423

424 BUSTIN, S. A. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription
425 polymerase chain reaction assays. **Journal Molecular Endocrinology**. v.25, p. 169–193.
426 2000.

427

428 CHAPMAN, J. R.; HELIN, A.S.; WILLE, M.; ATTERBY, C.; JÄRHULT, J.D.; FRIDLUND,
429 J.S.; WALDENSTRÖM, J. A. A panel of stably expressed reference genes for Real-Time
430 qPCR gene expression studies of mallards (*Anas platyrhynchos*). **Plos one**. v.11, n.2, p.1-18,
431 2016.

432

433 CHAVES, L. **Setor Agropecuário**. 2013. Disponível em: <[http://www.caprino-](http://www.caprino-ovinocultura.com.br/)
434 [ovinocultura.com.br/](http://www.caprino-ovinocultura.com.br/)>. Acesso em: 17 janeiro. 2016.

435

436 CHECHI, K.; GELINAS, Y.; MATHIEU, P.; DESHAIES, Y.; RICHARD, D.; Validation of
437 reference genes for the relative quantification of gene expression in human epicardial adipose
438 tissue. **PloS One**. v. 7, n. 4, p. 1-7, 2012.

439

440 DEL VESCO, A. P.; GASPARINO, E. ; ZANCANELA, V. ; GRIESER, D. O. ;
441 STANQUEVIS, C. E. ; POZZA, P. C. ; OLIVEIRA NETO, A. R. . Effects of selenium
442 supplementation on the oxidative state of acute heat stress-exposed quails. **Journal of Animal**
443 **Physiology and Animal Nutrition** (1986), p. n/a-n/a, 2016.

444

445

446 DHEDA, K.; HUGGETT, JF.; CHANG, J.S.; KIM, L.U.; BUSTIN, S. A.; JOHNSON, M.A.;
447 ROOK, G.A.; ZUMLA. A. The implications of using an inappropriate reference gene for real-
448 time reverse transcription PCR data normalization. **Analytical Biochemistry**. v. 344, p. 141–
449 143, 2005.

450

451 GONZALES, E.; SARTORI, J. R. Crescimento e metabolismo muscular. In: MACARI, M.;
452 FURLAN, R. L.; GONZALES, E. Fisiologia aviária aplicada a frangos de corte. 2. ed.
453 Jaboticabal: **Funep**. p.279-298, 2002.

454

455 GRUNE, T.; MERKER, K.; SANDIG, G.; et al. Selective degradation of oxidatively modified
456 445 protein substrates by the proteasome. **Biochemical and Biophysical Research**
457 **Communications**. v. 305, n. 3, p. 709-718, 2003.

458

459 GUÉNIN, S.; MAURIAT, M.; PELLOUX , J.; VAN WUYTSWINKEL, O.; BELLINI, C.;
460 Gutierrez, L. Normalization of qRT- PCR data: the necessity of adopting a systematic, 442
461 experimental conditions- specific, validation of references. **Clinical Biochemistry**.p.487- 493,
462 443 2009.

463

464 KHURSHID, N.; AGARWAL, V.; IYENGAR, S. Expression of mu- and delta-opioid
465 receptors in song control regions of adult male zebra finches (*Taenopygia guttata*). **Journal**
466 **Chemical Neuroanatomy**. v. 37,n.3,p. 158–169, 2009.

467

468 LISOWSKI, P.; PIERZCHAŁA, M.; GOŚCIK, J.; PAREEK C. S.; ZWIERZCHOWSKI L.
469 Evaluation of reference genes for studies of gene expression in the bovine liver, kidney,
470 pituitary, and thyroid. **Journal of Applied Genetics**. v. 49, p. 367-372. 2008.

471

472 MADEIRA, L. A.; SARTORI, J. R.; SALDANHA, E. S. P. B.; PIZZOLANTE, C. C.; SILVA,
473 M. D. P.; MENDES, A. A.; TAKAHASKI, S. E.; SOLARTE, W. V. N. Morfologia das fibras
474 musculares esqueléticas de frangos de corte de diferentes linhagens criados em sistemas de
475 confinamento e semiconfinamento. **Revista Brasileira de Zootecnia**. v.35, n.6, p. 2322-2332,
476 2006.

477

478 MARTÍNEZ-GINER, M.; NOGUERA, J.L, BALCELLS, I.; FERNÁNDEZ-RODRÍGUEZ,
479 A.; PENA, R.N. Selection of Internal Control Genes for Real-Time Quantitative PCR in
480 Ovary and Uterus of Sows across Pregnancy. **PLoS ONE**. v. 8, n. 6, p.1-9, 2013.

481 McCURLEY, A. T.; CALLARD, G. V. Characterization of housekeeping genes in zebrafish:
482 male-female differences and effects of tissue type, developmental stage and chemical
483 treatment. **BMC molecular Biology**. v. 9, n. 102, p. 1-12, 2008.

484

485 MO, F.; ZHAO, J.; LIU, N. Validation of reference genes for RT-qPCR analysis of CYP4T
486 expression in crucian carp. **Genetics and Molecular Biology**. v. 37, n. 2, p. 500-507, 2014.

487

488 NAJAFPANAH, M. J.; SADEGHI, M.; BAKHTIARIZADEH, M.R.; Reference Genes
489 Selection for Quantitative Real-Time PCR Using RankAggreg Method in Different Tissues of
490 Capra hircus. **PLoS ONE** .v. 8, n.12, p. 1-10, 2013.

491

492 NASCIMENTO, C.S.; BARBOSA, L.T.; BRITO, C.; FERNANDES, R.P.M.; MANN, R.S.;
493 PINTO, A.P.G.; OLIVEIRA.H.C.; DODSON, M.V.; GUIMARÃES, S.E.F.; DUARTE, M.S.
494 Identification of suitable reference genes for real time quantitative polymerase chain reaction
495 assays on pectoralis major muscle in chicken (*Gallus gallus*). **PLOS one**, v. 10, n. 5, p.1-15,
496 2015.

497

498 NERREN, J. R.; HE, H.; GENOVESE, K.; KOGUT, M. H.; Expression of the avianspecific
499 toll-like receptor 15 in chicken heterophils is mediated by gram-negative and gram-positive
500 bacteria, but not TLR agonists. **Veterinary Immunology Immunopathology**. v. 136, p. 151–
501 156, 2010.

502

503 NYGARD, A.B.; JORGENSEN, C.B.; CICERA, S.; FREDHOLM, M. Selection of reference
504 genes for gene expression studies in pig tissues using *SYBR Gree* qPCR. **BMC Molecular**
505 **Biology**. v.8, n.67, p.1-6, 2007.

506

507 OLIAS, P.; ADAM, I.; MEYER, A.; SCHARFF, C.; GRUBER, A.D. Reference genes for
508 quantitative gene expression studies in mutiple avian species. **Plos one**. v.9, n.6, p.1-12, 2014.

509

510 PFAFFL, M. W.; A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR.
511 **Nucleic Acids Research**. v. 29, n. 9, 2001.

512

513 PFAFFL, M. W.; TICHOPAD, A.; PRGOMET, C. et al. Determination of stable housekeeping
514 genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper-excel-based tool
515 472 using pair-wise correlations. **Biotechnology Letters**. v.26, s/n, p. 509–515, 2004.

516 PIERZCHALA, M.; LISOWSKI, P.; URBANSKI, P.; PAREEK, C. S.; COOPER, R.G.; 465
517 JOLANTA, K. Evaluation based selection of housekeeping genes for studies of gene 466
518 expression in the porcine muscle and liver tissues. **Animal Veterinary Advances**, v.10, 467
519 p.401- 405, 2011.
520
521 RADONIC, A.; THULKE, S.; MACKAY, I. M.; LANDT, O.; SIEGERT, W.; NITSCHKE, A.
522 Guideline to reference gene selection for quantitative real-time PCR. **Biochemical Biophysical**
523 **Research Communications**. v.313, n.4,p. 856–862, 2004.
524
525 SCULLEY, D. G.; DAWSON, P.A.; EMMERSON, B. T.; GORDON, R.B.A. Review of the
526 molecular basis of hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase (HPRT) deficiency. v.90,
527 n.3,p.195-207,1992.
528
529 SILVER, N.; BEST, S.; JIANG, J. et al. Selection of housekeeping genes for genes expression
530 studies in human reticulocytes using real time PCR. **BMC Molecular Biology**. v.7, s/n, 2006.
531
532 TARZE, A.; DENIAUD, A.; BRAS, M. Le. GAPDH, a novel regulator of the pro-apoptotic
533 483 mitochondrial membrane permeabilization. **Oncogene**, v.26, s/n, p. 2606-2620, 2007.
534
535 VANDESOMPELE, J.; DE PRETER, K.; PATTYN, F. Accurate Normalization of real-time
536 Quantitative RT-PCR data by Geometric Averaging of Multiple Internal Control Genes.
537 **Genome Biology**. v. 18 s/n, p. 3-7, 2002.
538
539 VEAZEY, K. J.; GOLDING, M. C.; Selection of stable reference genes for quantitative RT-
540 PCR comparisons of mouse embryonic and extra-embryonic stem cells. **PloS One** v. 6, n.11,
541 2011.
542
543 YANG , C.G.; WANG, X. L.; TIAN, J.; LIU, W.; WU, F.; JIANG, M.; WEN, H.; Evaluation
544 of reference genes for quantitative real-time RT-PCR analysis of gene expression in Nile
545 tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Gene**. v.527, n. 1, p. 183-92, 2013.
546
547 YIN, R.; LIU, X.; LIU, C.; DING, Z.; ZHANG, X.; TIAN, F.; LIU, W.; YU, J.; LI, L.
548 Systematic selection of housekeeping genes for gene expression normalization in chicken
549 embryo fibroblasts infected with Newcastle disease virus. **Biochemical Biophysical Research**
550 **Communications**. v. 413, p. 537–540, 2011.

551 ZANG, R .; BAI J.; XU, H.; ZHANG, L.; YANG, J.; YANG ,L.; LU, J.; WU, J. Selection of
552 suitable reference genes for real-time quantitative PCR studies in Lanzhou fat-tailed sheep
553 (*Ovis ares*). **Asian Journal of Animal and Veterinary Advances** Year. v. 6, n. 8, p.789 –
554 804, 2011.
555
556 ZINZOW-KRAMER, W. M.; HORTON, B. M.; MANEY, D. L. Evaluation of Reference
557 Genes for Quantitative Real-Time PCR in Songbirds. **Hormones and Behavior**, v. 66, n. 2, p.
558 267-275, 2014.